

Numéro d'enregistrement
au CNRS : A.O. 10 904

THESE

PRESENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE NANCY I
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES
PAR

Gaston DUPONT

VIRUS DE LA MOSAÏQUE JAUNE DU NAVET : ETUDE DE L'ACIDE
RIBONUCLEIQUE BICATENAIRE ISOLÉ DE FEUILLES DE
« BRASSICA CHINENSIS » INFECTÉES .

SOUTENUE LE 21 mars 1975 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. L. HIRTH Président

P. BOTHOREL
J.M. BOVE
P. HORN
J. NEEL
S. PREMILAT

Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555415_0017

THESE

PRESENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE NANCY I
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES
PAR

Gaston DUPONT

VIRUS DE LA MOSAÏQUE JAUNE DU NAVET : ETUDE DE L'ACIDE
RIBONUCLEIQUE BICATENAIRE ISOLÉ DE FEUILLES DE
« BRASSICA CHINENSIS » INFECTÉES .

SOUTENUE LE

1975 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.

L. HIRTH

Président

P. BOTHOREL

J.M. BOVE

P. HORN

J. NEEL

Examineurs



- AVANT - PROPOS -

Le travail que je vais exposer a été entrepris au laboratoire de Monsieur le Professeur P. HORN. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon respectueux attachement et de ma profonde gratitude pour la sollicitude avec laquelle il m'a initié à la biophysique et a guidé mes recherches, pour les conseils et encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Une partie de cette étude a été effectuée à la station de Physiologie et de Biochimie végétales du Centre de Recherches Agronomiques de BORDEAUX. Je tiens à assurer son directeur, Monsieur le Professeur J.M. BOVE de ma sincère reconnaissance pour sa bienveillance et son précieux concours.

Très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur le Professeur L. HIRTH en acceptant de présider le jury de cette thèse, je lui adresse mes remerciements les plus chaleureux.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur P. BOTHOREL pour l'intérêt qu'il m'a manifesté et je lui suis très obligé d'avoir bien voulu faire partie de mon jury d'examen.

Je prie Monsieur le Professeur J. NEEL d'agréer mes remerciements sincères pour avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur F. SUHNER m'a permis d'effectuer des mesures de densité dans son laboratoire et je suis heureux de lui exprimer ici ma gratitude.

Je ne saurais passer sous silence l'aide amicale que je dois à tous les membres du laboratoire de biophysique de l'Université de NANCY I et de la station de Physiologie et de Biochimie végétales du Centre de Recherches Agronomiques de BORDEAUX. Je remercie en particulier Madame C. BOVE, Madame J. KRISCHER, Monsieur G. ALBISER et Monsieur Y. SERE qui ont pris une part active à la réalisation de certaines expériences.

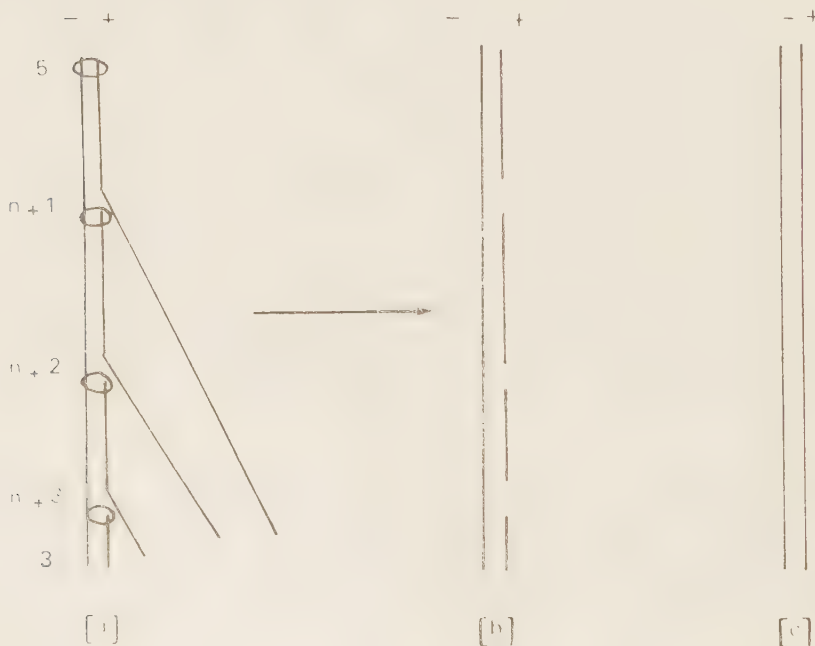
_ INTRODUCTION _

Dans une cellule infectée par un virus à RNA monocaténaire, non oncogène, le DNA de la cellule hôte n'intervient pas directement dans la répllication du RNA viral . En effet, en présence d'une substance qui, comme l'actinomycine D, inhibe la transcription du DNA (REICH et GOLDBERG, 1964 ; WARING, 1970 ; SOBELL , 1973) on observe néanmoins la formation de RNA viral aussi bien dans le cas des bactériophages tels que MS 2 (HAYWOOD et SINSHEIMER, 1963) que dans celui des virus des animaux tels que le mengovirus (HONMA et GRAHAM, 1962 ; REICH et coll., 1962 ; FRANKLIN et BALTIMORE, 1962 ; PLAGEMAN et SWIN, 1966 a), le poliovirus (REICH et coll., 1961 ; SHATKIN, 1962 ; ZIMMERMAN et coll., 1963 ; BALTIMORE et coll., 1964), le virus de la maladie de NEWCASTLE (KINGSBURY, 1962), le sindbis virus (LEVY et coll., 1963), le sendai virus (BUKRINSKAYA et ZHDANOV, 1963), le virus de l'encéphalomyocardite (EASON et coll., 1963) et que dans celui des virus des végétaux tels que le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (SÄNGER et KNIGHT, 1963), le virus de la mosaïque jaune du navet (VMJN) (GIGOT et coll., 1965), le virus du "bean pot mottle" (BANCROFT et KEY, 1964) .

Cette synthèse doit donc être non pas DNA dépendante, mais RNA dépendante et par conséquent nécessiter la participation d'une chaîne ribonucléique dont la séquence soit complémentaire de celle du RNA viral .

Chez les virus à RNA "plus", c'est-à-dire ceux dont le RNA viral joue le rôle de RNA messenger pour la synthèse des protéines virales, cette chaîne de RNA complémentaire est synthétisée dans la cellule infectée à partir du RNA viral "plus" utilisé comme matrice par une enzyme nouvelle spécifique de l'infection, la RNA replicase. Dans une phase ultérieure, les chaînes virales "moins" serviront à leur tour de matrice pour la synthèse de nouvelles chaînes virales "plus". Le complexe formé entre une chaîne "moins" matricielle et une ou plusieurs molécules de replicase en voie de synthétiser des chaînes "plus" a été appelé "intermédiaire de replication".

Par ailleurs, dans le cas des virus à RNA "plus", ces chaînes "moins" n'ont jamais été isolées à l'état monocaténaire, mais toujours associées par liaisons hydrogène au RNA "plus". Ce fait a amené ERICKSON et coll. (1964) à proposer la structure suivante (schéma a) pour l'intermédiaire de replication. Dans cette structure, la chaîne "moins" est quasiment sur toute sa longueur sous forme bicaténaire.



Au fur et à mesure que de nouvelles molécules de réplicase, telles que $n + 2$, $n + 3$,... transcrivent la chaîne "moins" en chaîne "plus", elles dégagent les extrémités 5' des chaînes synthétisées précédemment hors de la structure bicaténaire. Ainsi, dans cette hypothèse, l'intermédiaire de réplication est à la fois bicaténaire et monocaténaire.

MONTAGNIER et SANDERS (1963) sont les premiers auteurs à avoir isolé un RNA bicaténaire à partir de cellules de KREBS infectées par le virus de l'encéphalomyocardite (VEMC). Du RNA bicaténaire a été également isolé à partir de bactéries infectées par le phage MS 2 (KELLY et SINSHEIMER, 1964 ; WEISSMANN et coll., 1964) le phage R 17 (FENNICK et coll., 1964 ; FRANKLIN, 1966, 1967 a, 1967 b), le phage M 12 (AMMAN et coll., 1964) le phage Fr (KAERNER et HOFFMANN-BERLING, 1964 a, 1964 b) et le phage β (NONOYAMA et IKEDA, 1964) et à partir de cellules animales infectées par le poliovirus (BALTIMORE et coll., 1964 ; PONS, 1964 ; BALTIMORE, 1966) ; le virus de la fièvre aphteuse (BROWN et CARTWRIGHT, 1964) ; le mengovirus (PLAGEMANN et SWIM, 1966 b) ; le "Semliki Forest Virus" (FRIEDMAN et SONNABEND, 1965).

Dans le cas des virus des végétaux, on a pu isoler du RNA bicaténaire, résistant à la RNase, à partir de nombreuses plantes virosées : tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (SHIPP et HASELKORN, 1964 ; BURDON et coll., 1964 ; MANDEL et coll., 1964 ; NILLSON-TILLGREN, 1970 ; JACKSON et coll., 1971), chou de Chine infecté par le virus de la mosaïque jaune du navet (VMJN) (RALPH et coll., 1965 ; GIGOT et coll., 1965 ; GIGOT et HIRTH, 1965 ; BOVE, 1967), orge infectée par le virus de la mosaïque du brome (HIRUKI et KAESBERG, 1965, HIRUKI, 1969), vigne infectée par le virus de la mosaïque du vigna (VAN GRIENSVEN et VAN KAMMEN, 1969 ; VAN GRIENSVEN et coll., 1973), orge infectée par le "barley stripe mosaic virus" (PRING, 1972).

Dans le cas des virus à génome ribonucléique segmenté, c'est-à-dire dont le génôme est constitué d'un certain nombre de segments de RNA différents, encapsidés dans plusieurs particules, on trouve souvent autant de types de RNA bicaténaire que de segments de RNA viral .Ainsi, on peut préparer à partir de plantes infectées par le virus de la mosaïque du vigna, deux types de RNA bicaténaire dont les propriétés montrent qu'ils correspondent respectivement à chacun des deux composants du RNA viral (VAN GRIENSVEN et KAESBERG, 1969 ; VAN GRIENSVEN et coll., 1973) . Il en est de même pour le virus de la mosaïque de la luzerne : on trouve dans les végétaux infectés quatre types de RNA bicaténaire correspondant respectivement à chacun des quatre composants du RNA viral (PINCK et HIRTH, 1972) .

En ce qui concerne le VMJN, RALPH et coll. (1965) ont montré que les feuilles de chou de Chine infectées par ce virus incorporent de l'orthophosphate marqué au ^{32}P dans une structure ribonucléique bicaténaire . La composition en bases de ce RNA bicaténaire, déterminée d'après la radioactivité incorporée, correspond pour un marquage court (30 minutes) à celle du RNA viral "plus" et à celle d'un RNA bicaténaire dont l'une des chaînes est le RNA viral pour un marquage long (huit jours) . Ceci montre que le "turn-over" des chaînes "plus" est plus rapide que celui des chaînes "moins" .

Ces auteurs ont extrait des plantes infectées un RNA résistant à la RNase . Cependant, d'après le coefficient de sédimentation, le produit isolé a une taille nettement inférieure à celle que l'on pourrait attendre en supposant que l'une des deux chaînes est le RNA viral . Ils expliquent ces résultats en supposant que les molécules de RNA bicaténaire ont été partiellement dégradées au cours de l'isolement .

De même BOCKSTAHLER (1967) et WOLSTENHOME et BOCKSTAHLER (1967) ont isolé un RNA bicaténaire, spécifique du VMJN, et dont la composition en bases est celle attendue pour un complexe dont l'une des chaînes serait le RNA viral . Cependant, le RNA que ces auteurs ont étudié était très hétérogène, de coefficient de sédimentation peu élevé et sa longueur, déterminée par microscopie électronique, était beaucoup trop faible pour que l'on puisse

supposer que ce complexe contienne des chaînes virales entières .

Indépendamment, BOVE et coll. (1965) et BOVE (1967) ont mis en évidence dans des extraits acellulaires de chou de Chine infecté par le VMJN la présence, non seulement d'une activité RNA polymérase DNA dépendante, qui existe également dans les extraits de plantes saines, mais surtout d'une activité RNA polymérase DNA indépendante, spécifique de l'infection et due à la RNA réplique virale .

BOVE (1967) a montré qu'in vitro le produit de cette réplique était un segment de RNA viral "plus" qui, après isolement et purification se retrouve dans une structure bicaténaire, en association avec la chaîne de RNA "moins" qui a servi de matrice à sa synthèse . En réalité, dans la préparation acellulaire active, appelée 100 P2 10000 (V), la réplique forme un complexe enzyme-matrice avec la chaîne "moins" . En outre, ce complexe est lié à un système membranaire formé par les enveloppes de chloroplastes auxquelles sont attachées de nombreuses vésicules spécifiques de l'infection (LAFLECHE et BOVE, 1971 ; LAFLECHE et coll., 1972) . L'activité de ce complexe, in vitro, se traduit par l'élongation, sur 100 à 200 résidus nucléotidiques, de chaînes virales "plus" dont l'initiation avait déjà commencé in vivo (LAFLECHE et coll., 1972 ; MOUCHES, 1975) .

En ce qui concerne le RNA bicaténaire, l'avantage de la synthèse de RNA viral in vitro, à partir de la préparation 100 P2 10000 (V), réside dans le fait que cette synthèse se traduit essentiellement par le marquage spécifique du RNA bicaténaire et plus précisément par son marquage dans la chaîne "plus" . Ce marquage facilite grandement l'étude de la molécule . Indépendamment de toute synthèse in vitro, la préparation 100 P2 10000 (V) peut aussi être utilisée comme source du RNA bicaténaire (BOVE, 1967 ; LAFLECHE et coll., 1972, MOUCHES, 1975) .

Ainsi, la préparation 100 P2 10000 (V) peut servir avant ou après la synthèse *in vitro*, comme point de départ pour la purification de RNA bicaténaire . Si la purification a lieu après synthèse *in vitro*, celui-ci sera marqué dans la chaîne "plus" en fonction du nucléoside 5' triphosphate radioactif utilisé .

Enfin, le fait même que le RNA bicaténaire se marque au cours de la synthèse *in vitro* et précisément au niveau de la chaîne "plus" montre qu'il joue un rôle dans cette répllication et qu'il est dès lors licite de l'envisager comme un intermédiaire de répllication .

Le présent travail a été entrepris dans le but de déterminer les propriétés physico-chimiques du RNA bicaténaire extrait de la préparation acellulaire 100 P2 100000 (V) et d'en préciser la structure .

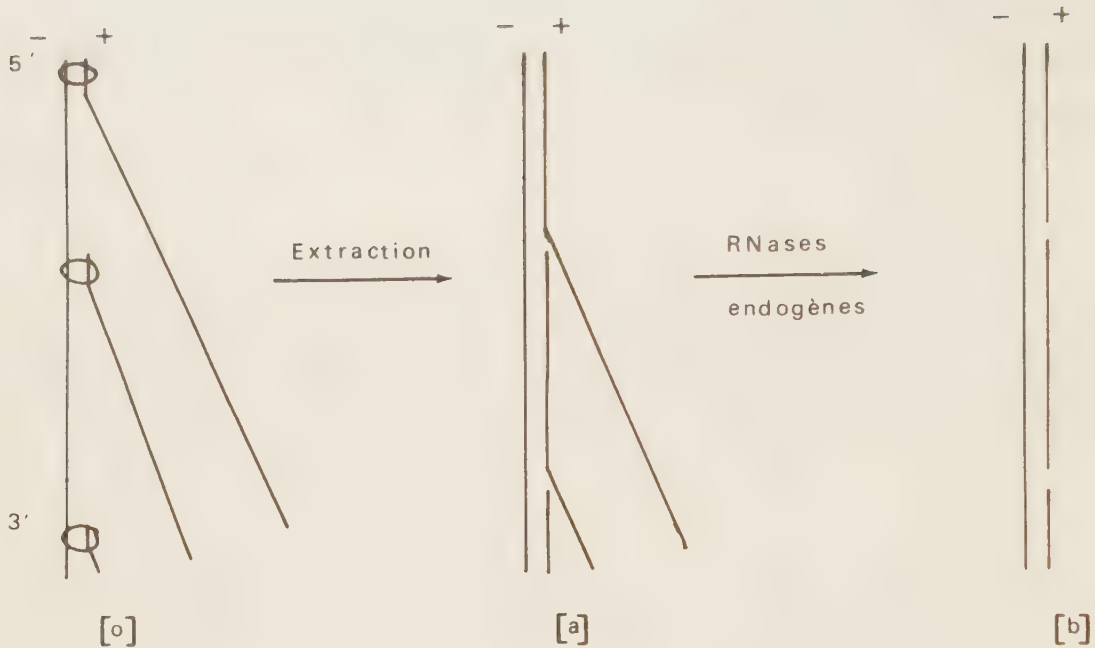
Nos premières expériences ont montré que ce RNA bicaténaire était très monodisperse et avait une masse moléculaire de 4.10^6 , double de celle du RNA viral monocaténaire et qu'en outre il était totalement bicaténaire, ne possédant pas de parties monocaténaires . Il nous est donc rapidement apparu que cette structure pouvait représenter la "colonne vertébrale" de l'intermédiaire de répllication . En effet, lors des quelques 30 minutes que dure la préparation de la fraction acellulaire 100 P2 10000 (V) à partir des feuilles infectées, les RNases endogènes ont le temps d'hydrolyser les parties monocaténaires non protégées . Si tel est le cas, le caractère monodisperse du RNA bicaténaire isolé résulterait de la présence d'une chaîne "moins" entière, alors que le RNA "plus" présenterait des coupures selon le schéma b . Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse qui, si elle s'avérait, permettrait d'envisager le RNA bicaténaire comme source de chaînes "moins" entières . Celles-ci pourraient dès lors être soumises *in vitro* à la RNA - répllicase du VMJN purifiée en tant que matrice pour la synthèse de chaînes virales entières, voire infectieuses .

Enfin, il apparaît de plus en plus que les structures virales bicaténaïres isolées de cellules infectées sont des artéfacts dus aux techniques d'isolement et de purification des RNA (utilisation du phénol, des détergents...) .

Cette possibilité a d'abord été envisagée par WEISSMANN et son équipe (FEIX et coll., 1967 ; WEISSMANN et coll., 1967 ; FEIX et coll. 1968) et par HOFSCHNEIDER (1968) et documentée expérimentalement par HOFSCHNEIDER (1971), KEIL et HOFSCHNEIDER (1973), THACH et THACH (1973), et THACH et coll. (1974) .

Dans le cas du VMJN, il semble aussi que des intermédiaires de réplication dans lesquels les chaînes "moins" soient essentiellement sous forme bicaténaire n'existent pas in vivo . En effet, des structures bicaténaïres de ce type n'ont pas pu être décelées sur coupes ultrafines après un marquage in vivo des RNA viraux par l'uridine tritiée (BOVE et coll., 1974 ; GARNIER, 1975) .

Par contre, dans la préparation subcellulaire 100 P2 10000 (V), utilisée dans le travail présenté ici, il semble que les chaînes "moins" soient sous forme bicaténaire (BOVE et coll., 1968) . Ainsi, il semblerait que dès le broyage des feuilles infectées et le début des opérations conduisant à la préparation 100 P2 10000 (V), la formation de la colonne vertébrale bicaténaire ait lieu, les RNases endogènes hydrolysant ensuite les parties restant monocaténaïres :



Pour notre travail axé sur la mise en évidence, voire l'isolement, d'une chaîne "moins" entière, il importe relativement peu que la structure (b) vienne directement de (a) ou de (o) par l'intermédiaire de (a) .

Pour l'étude des structures ribonucléiques, nous avons fait appel à l'ultracentrifugation analytique . C'est une technique particulièrement bien adaptée à l'étude des macromolécules en solution et nous l'avons souvent employée . Dans un premier chapitre, nous en rappellerons donc les principes et nous décrirons l'appareil utilisé .

D'autre part, pour interpréter nos résultats concernant le RNA bicaténaire, il nous a paru nécessaire de préciser certaines propriétés du RNA viral . La deuxième partie de cet exposé sera donc consacrée à la

préparation de ce RNA et à l'étude de certaines de ses propriétés .

Ensuite, nous consacrerons un chapitre à l'isolement du RNA bicaténaire, puis nous en décrirons les propriétés physico-chimiques .

Enfin, nous exposerons les résultats concernant la dénaturation de ce composé et nous en tirerons les conclusions quant à sa structure .Elles résident principalement dans le fait qu'une chaîne de RNA "moins" entière semble bien être présente dans la molécule de RNA bicaténaire .

- CHAPITRE I -

ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

L'ultracentrifugation analytique est une technique d'étude des propriétés hydrodynamiques des macromolécules en solution et plus particulièrement de leur mouvement sous l'influence d'un champ d'accélération élevé, ainsi que de leur distribution à l'équilibre .

I - 1 - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION

Le principe de la mesure est le suivant : une solution de macromolécules est placée dans une cellule de centrifugation animée d'un mouvement de rotation de vitesse angulaire ω . Dans un système de référence lié à la cellule, les particules sont soumises à une force d'inertie $\vec{F}$:

$$\vec{F} = - m (1 - \bar{v}\rho) \vec{\gamma}$$

m est la masse des particules

$\bar{v}$ leur volume spécifique partiel

ρ la densité du solvant

$\gamma = \omega^2 r$, où ω est la vitesse de rotation et r la distance d'un point à l'axe de rotation .

Les particules ainsi accélérées acquièrent une vitesse $\frac{d\vec{r}}{dt}$ par rapport au solvant qui exerce sur elles une force de frottement $\vec{F}'$ opposée à $\frac{d\vec{r}}{dt}$:

$$\vec{F}' = -f_s \frac{d\vec{r}}{dt}$$

f_s est une constante positive ; c'est le coefficient de frottement de la particule dans le solvant considéré .

La vitesse $\frac{d\vec{r}}{dt}$ atteint une valeur limite $\frac{d\vec{r}}{dt}_{\text{lim.}}$, lorsque les deux forces opposées F et F' ont même valeur absolue, c'est-à-dire :

$$m (1 - \bar{v}\rho) \gamma - f_s \frac{d\vec{r}}{dt}_{\text{lim.}} = 0 \quad (1)$$

Etant donné la faible taille des particules, la vitesse limite est atteinte pratiquement instantanément . Il en résulte un flux de macromolécules, $\frac{dm}{dt}_s$, dû à la sédimentation :

$$\frac{dm}{dt}_s = c(r) \frac{dr}{dt}_{\text{lim.}} A$$

$c(r)$ est la concentration au point d'abscisse r

A l'aire de la section de la cellule de centrifugation normale à l'accélération

$\frac{dm}{dt}_s$ la masse des particules de soluté qui traverse A par unité de temps .

Dans le cas d'une solution homogène d'un composé isomoléculaire, toutes les particules se déplacent à la même vitesse et, si on néglige les phénomènes de diffusion, on peut représenter les répartitions des molécules, après différents temps de centrifugation T_0 , T_1 , T_2 et T_3 par les courbes en trait plein portées sur la Fig. 1 .

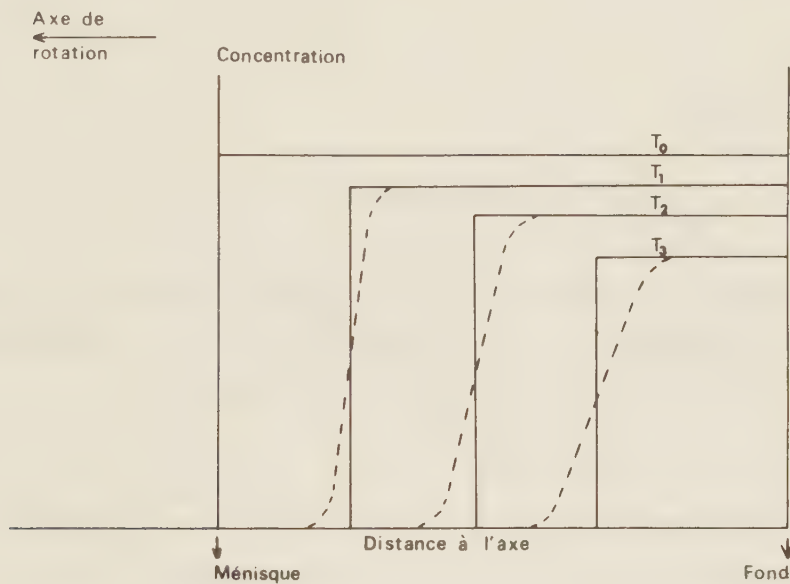


Figure 1 - Ultracentrifugation analytique : répartition des concentrations en soluté dans la cellule, après différents temps de centrifugation .

_____ Cas idéal négligeant les phénomènes de diffusion
- - - - Cas réel tenant compte des phénomènes de diffusion

On trouve au voisinage du ménisque, une région de solvant pur, puis la concentration en soluté augmente brusquement et reste constante jusqu'au fond de la cellule . On dit qu'il y a sédimentation libre . Enfin, le soluté s'accumule au fond de la cellule .

En fait, au processus de sédimentation se superposent des phénomènes de diffusion : le gradient de concentration au niveau de la frontière solvant-soluté provoque une migration des macromolécules vers les régions de faible concentration . Ainsi, au flux de sédimentation, s'ajoute un flux de diffusion $\frac{dm}{dt} D$, que l'on définit de façon analogue à $\frac{dm}{dt} s$ et qui est exprimé par la première loi de FICK :

$$\frac{dm}{dt} D = - D \frac{dc}{dr} A$$

D est le coefficient de diffusion du soluté .

Ces phénomènes ont pour effet d'élargir la frontière solvant-soluté au cours de la centrifugation, et les répartitions réelles des concentrations sont données par les courbes en pointillés de la Fig. 1 .

A partir de ce type de courbes, on détermine le coefficient de sédimentation des molécules étudiées soit, par définition, la vitesse de déplacement des molécules dans la région plateau par unité d'accélération :

$$s = \frac{1}{\gamma} \frac{dr}{dt} = \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt}$$

ou encore

$$s = \frac{1}{\omega^2} \frac{d \ln r}{dt} \quad (2)$$

Le coefficient de sédimentation, qui a les dimensions d'un temps, s'exprime généralement en svedberg, 1 svedberg étant égal à 10^{-13} seconde .

Le terme $\frac{d \ln r}{dt}$ est égal à la pente de la droite obtenue en portant $\ln r$ en fonction de t . Nous avons également déterminé la valeur de ce terme en calculant, à l'aide d'un calculateur Hewlett-Packard 9100 B, la pente de la droite des moindres carrés correspondant aux points expérimentaux. Cette dernière méthode présente quelques avantages : elle est plus rapide, elle permet d'éviter les erreurs subjectives de la méthode graphique et d'évaluer la précision du résultat final.

Il n'est évidemment pas possible de suivre le déplacement des molécules d'une région où la concentration est constante, c'est-à-dire de la région plateau. On observe donc le mouvement de la frontière solvant-solution au cours de la centrifugation. Mais, si cette frontière s'élargit au cours du processus de sédimentation, soit à cause de phénomènes de diffusion non négligeables, soit parce que le soluté est polydisperse, tous les points de cette frontière ne se déplaceront pas à la même vitesse. Il est donc important de déterminer le point de la frontière dont la vitesse, par unité d'accélération, est égale à la vitesse moyenne des molécules de soluté dans la région plateau. GOLDBERG (1958) a montré que l'abscisse de ce point est définie par la racine carrée du second moment de la courbe de gradient de concentration. Mais on obtient une très bonne approximation, surtout lorsque les phénomènes de diffusion ne sont pas trop importants, en prenant comme référence l'abscisse du point de la frontière où la concentration des macromolécules est égale à la moitié de la concentration dans la région plateau. Dans l'expression du coefficient de sédimentation qui vient d'être donnée, r est donc l'abscisse de ce point de la frontière. Afin de pouvoir comparer les résultats des différentes expériences, on ramène la valeur du coefficient de sédimentation déterminée dans des conditions de température et de solvant données, s_{obs} , à celle obtenue dans des conditions standard, à savoir le coefficient de sédimentation qu'auraient les mêmes molécules en solution dans l'eau et à la température de 20°C. Pour cela, on admet que le solvant est incompressible, ce qui permet d'utiliser la relation de SVEDBERG et PEDERSEN (1940)

$$S_{20,w} = S_{T,SI} \frac{\eta_{Tw}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{T,SI}}{\eta_{T,w}} \cdot \frac{1 - \bar{V}_{20,w} \rho_{20,w}}{1 - \bar{V}_{T,SI} \rho_{T,SI}} \quad (3)$$

où $s_{20,w}$ est le coefficient de sédimentation dans les conditions standard .

$s_{T,SI}$ est le coefficient de sédimentation observé (dans le solvant SI et à la température T)

η_{Tw} la viscosité de l'eau à la température T

$\eta_{20,w}$ la viscosité de l'eau à la température de 20°C

$\eta_{T,SI}$ la viscosité du solvant à la température T

$\bar{V}_{20,w}$ le volume spécifique partiel du soluté dans l'eau à 20°C

$\bar{V}_{T,SI}$ le volume spécifique partiel du soluté dans le solvant SI à la température T

$\rho_{20,w}$ la masse spécifique de l'eau à 20°C

$\rho_{T,SI}$ la masse spécifique du solvant à la température T .

Parmi les différents facteurs qui interviennent dans le calcul de $s_{20,w}$, c'est la température qui a le plus d'importance . En effet, la viscosité des liquides varie beaucoup avec la température et en milieu aqueux et il suffit d'une erreur de 0,4°C sur l'évaluation de ce paramètre pour que le coefficient de sédimentation soit erroné de 1% .

I - 2 - EQUILIBRE DE SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE

L'ultracentrifugation analytique peut donner lieu à un autre type d'expérience qui permet de déterminer des paramètres moléculaires importants : la masse moléculaire, la densité et le coefficient de diffusion . C'est l'équilibre de sédimentation en gradient de densité qui a été mis au point et développé notamment par MESELSON, (1957) et SCHMIT et HEARST (1971) .

I - 2 - 1 - EQUILIBRE DE SEDIMENTATION

Si l'on centrifuge une solution aqueuse de sulfate de césium, ce sel subit une sédimentation partielle . Lorsque l'équilibre de sédimentation-diffusion est atteint, il existe dans la cellule de centrifugation un gradient de concentration saline, donc un gradient de densité, que l'on peut exprimer par la relation :

$$\frac{d\rho}{dr} = \frac{1}{\beta_0} \omega^2 r \quad (4)$$

où β_0 est un paramètre caractéristique du sel utilisé .

En outre, si la solution saline contient des molécules d'acide nucléique par exemple, celles-ci migrent vers le point de la cellule où la densité de la solution est égale à leur densité de flottation et s'y rassemblent en une bande étroite . Pour un échantillon de macromolécules monodisperse en densité et en masse moléculaire, la concentration, à l'équilibre, vérifie l'égalité :

$$c = c_0 \exp. \left(- \frac{(r - r_0)^2}{2 \sigma^2} \right)$$

où c est la concentration en macromolécules au point d'abscisse r

c_0 est la concentration en macromolécules au point d'abscisse r_0

r_0 est la distance entre le centre de la bande et l'axe de rotation

σ est l'écart type de la répartition de concentration des macromolécules .

Donc, on en déduit :

$$\ln c = \ln c_0 - \frac{1}{2 \sigma^2} (r - r_0)^2 \quad (5)$$

En d'autres termes, la répartition des macromolécules dans la cellule de centrifugation, à l'équilibre, suit la loi de GAUSS .

De plus, la largeur de la bande, σ , dépend de la masse M des macromolécules :

$$\sigma = \frac{R T}{M \frac{1}{\rho_0} \frac{d\rho}{dr} \omega^2 r_0} \quad (6)$$

La densité au centre de la bande, ρ_0 , peut être calculée par référence à la densité initiale ρ_i de la solution saline :

$$\rho_0 = \rho_i + \int_{r_i}^{r_0} \frac{d\rho}{dr} dr \quad (7)$$

r_i étant l'abscisse du point isopycnique, c'est-à-dire du point où la densité de la solution, à l'équilibre, est égale à la densité initiale. La différence $(\rho_0 - \rho_i)$ peut être obtenue soit à partir de l'expression approchée de $\frac{d\rho}{dr}$:

$$\rho_0 - \rho_i = \frac{1}{2} \frac{\omega^2}{\beta_0} (r_0^2 - r_i^2) \quad (8)$$

soit en déterminant expérimentalement la valeur du gradient de densité à l'aide d'un système optique approprié. La relation (8) n'est applicable que dans la mesure où le coefficient β_0 est indépendant de la concentration saline. Nous verrons que ce n'est pas le cas pour le sel utilisé ; c'est pourquoi nous aurons recours à la deuxième méthode.

Les clichés pris au début et à la fin de la centrifugation permettent, connaissant les constantes du système optique de l'ultracentrifugation, de déterminer le gradient d'indice $\frac{dn}{dr}$, dû au gradient de concentration de sulfate de césium, en tout point de la cellule, (IFFT et coll) (1970). Les constantes optiques de la centrifugeuse sont déterminées à l'aide d'une cellule de calibration.

Le gradient de densité peut être calculé à partir de la variation d'indice . En effet :

$$\frac{d\rho}{dr} = \frac{d\rho}{dn} \frac{dn}{dr} \quad (9)$$

Or, le terme $\frac{d\rho}{dn}$ se déduit de la relation liant l'indice de réfraction d'une solution saline à sa densité :

$$\rho = an + b$$

$$\text{d'où } \frac{d\rho}{dn} = a$$

Finalement, en remplaçant $\frac{d\rho}{dn}$ par cette valeur dans l'expression (9), on obtient :

$$\frac{d\rho}{dr} = a \frac{dn}{dr} \quad (10)$$

Le gradient de densité est donc égal, à une constante près, au gradient d'indice qui, lui, peut être déterminé expérimentalement .

Les paramètres que nous venons de définir, densité de flottation et masse moléculaire, sont calculés à l'équilibre de sédimentation-diffusion . L'étude de la transition vers l'équilibre peut également être intéressante .

I - 2 - 2 - TRANSITION VERS L'EQUILIBRE

L'analyse de la répartition des macromolécules au cours de la transition vers l'état d'équilibre permet en particulier d'étudier un autre paramètre caractéristique, D/σ^2 , D étant le coefficient de diffusion et σ la demi largeur de la bande de soluté à l'équilibre (MESELSON et NAZARIAN (1963), SCHMID et HEARST (1972) .

On détermine ce dernier à partir des moments de la répartition de polymère dans la cellule de centrifugation, qui sont eux-même définis par les expressions :

$$\mu_0(t) = \int_{r_m}^{r_f} c(r,t) dr$$

$$\mu_1(t) = \int_{r_m}^{r_f} r c(r,t) dr \quad (12a)$$

$$\mu_2(t) = \int_{r_m}^{r_f} r^2 c(r,t) dr$$

où $c(r,t)$ est la concentration au point d'abscisse r et au temps t , r_f l'abscisse du fond de la cellule et r_m l'abscisse du ménisque . Si d'autre part, on admet que le gradient de densité est constant et que le soluté est homogène en densité et taille, les moments μ_1 et μ_2 sont alors liés au terme D/σ^2 par les relations :

$$\mu_1(t) = \mu_1(t=0) \exp. \left(- \frac{D}{\sigma^2} t \right)$$

$$\mu_2(t) - \mu_2(t=\infty) = (\mu_2(t=0) - \mu_2(t=\infty)) \exp. \left(- \frac{2D}{\sigma^2} t \right) \quad (12)$$

Pour déterminer $\frac{D}{\sigma^2}$, il suffit donc de tracer la courbe représentant la variation du logarithme de $(\mu_2(t) - \mu_2(\infty))$ en fonction du temps ; la pente de la droite obtenue est proportionnelle à $-2D/\sigma^2$. On peut aussi calculer ce paramètre à partir des valeurs du premier moment de la distribution de polymère, mais les résultats sont généralement moins précis.

I - 3 - DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les expériences de centrifugation sont réalisées à l'aide d'une ultracentrifugeuse analytique Beckman, modèle E, dont nous donnerons les principales caractéristiques.

I - 3 - 1 - ROTORS

Nous disposons des rotors en aluminium AN-E et AN-D et du rotor en titane AN-H. La régulation de la vitesse de rotation est assurée par un dispositif électronique, commandé par une dynamo tachymétrique. Un compte tours permet de déterminer la vitesse moyenne, pour un temps suffisamment long, avec une grande précision.

Comme nous l'avons vu, la température influe beaucoup sur la viscosité des liquides et par conséquent sur le coefficient de sédimentation. Il est donc nécessaire de la contrôler avec précision. Elle est maintenue constante à 0,1°C près, par le système R.T.I.C.

I - 3 - 2 - CELLULES DE CENTRIFUGATION

La forme des cellules de centrifugation est importante. En effet, si celles-ci étaient rectangulaires, les molécules de soluté, qui sont soumises à une accélération radiale, heurteraient les parois, provoquant

des mouvements de convection . Aussi utilise-t-on des cellules en forme de secteur centré sur l'axe de rotation . Ces cellules sont fermées par des fenêtres de quartz transparent dans l'ultra-violet . Au cours des expériences que nous avons effectuées, nous avons le plus souvent utilisé des cellules à remplissage homogène, de 12 mm d'épaisseur, d'angle de secteur de 4°, et fabriquées en Kel-F, matériau synthétique chimiquement inerte .

I - 3 - 3 - DISPOSITIFS D' OBSERVATION

La centrifugeuse comporte des dispositifs optiques réfractométrique et photométrique qui permettent d'observer le contenu de la cellule au cours de la centrifugation .

Le système optique Philpot-Svenson (ou Schlieren) permet de déterminer, en tout point de la cellule, le gradient d'indice $\frac{dn}{dr}$ (r étant la distance entre le point considéré et l'axe de rotation) . Comme on peut admettre que l'indice de réfraction d'une solution varie linéairement avec la concentration en soluté, cette méthode permet de déterminer le gradient de concentration dc/dr .

Le principe du système optique à absorption est différent . Dans ce cas, on prend une photographie de la cellule, en utilisant de la lumière monochromatique de longueur d'onde telle qu'elle soit absorbée par le soluté et non par le solvant (260 nm pour les acides nucléiques dans l'eau) . Les régions de la plaque photographique correspondant au solvant sont donc plus impressionnées que celles correspondant au soluté . Ce dispositif permet de déterminer la concentration en soluté en tout point de la cellule, à condition de prendre un certain nombre de précautions . En effet, le noircissement de la plaque photographique n'est inversement proportionnel à la concentration en soluté, c'est-à-dire à la densité optique de la solution, que dans des limites relativement étroites . C'est pourquoi le temps de pose des clichés est toujours le même et nous n'utilisons pas de solution dont la densité optique à 260 nm soit supérieure à 0,8 . Les photographies sont prises sur

des plaques Kodak (Commercial Film, 6 127) et développées à l'aide de révélateur Kodak-D-11, dans des conditions standard : 5 mm à 20°C .

La lecture des clichés est effectuée au moyen d'un microphotodensitomètre réalisé au laboratoire .

- CHAPITRE II -

PREPARATION DE RNA MONOCATENAIRES

Le RNA du VMJN est extrait des virions purifiés . Nous exposerons donc la préparation du virus et l'extraction du RNA viral . Puis nous décrirons la purification des RNA ribosomiaux de E. coli , qui nous serviront de temoins lors de certaines expériences .

I - 1 - PURIFICATION DES VIRIONS

Le VMJN est isolé, selon la méthode de STEERE (1956) à partir de feuilles de chou de Chine (Brassica chinensis L, var. Wong Bock) infectées systématiquement . L'inoculation est effectuée de la manière suivante . Les plants de chou de Chine, obtenus sous forme de rosettes en serre, sont traités de façon à ce qu'il ne reste que les trois feuilles extérieures les plus belles . Celles-ci sont inoculées mécaniquement avec une suspension de virions à la concentration de 0,5 mg/ml dans un tampon phosphate 10^{-2} M, ph 7, en présence de carborandum (Prolabo, N° 400). Les premiers signes de l'infection apparaissent en général cinq à six jours après l'inoculation .

Trois semaines après l'inoculation des plants, les feuilles à infection systémique sont récoltées et lavées à l'eau distillée . Après addition d'un même poids du tampon de broyage TB 9 (tris 0,05M, ph 9, Mgcl₂ 0,008M, β-Mercapto-éthanol 0,009M), les feuilles sont broyées dans un appareil Turmix et l'homogénat obtenu, filtré sur gaze . Le filtrat recueilli est émulsionné au moyen d'un agitateur magnétique pendant 30 mn avec un égal volume de n - butanol et un égal volume de chloroforme, à la chambre froide à 4°C . L'émulsion est rompue par centrifugation à basse vitesse (10 mn à 4 000 t/mn) et on recueille la phase aqueuse qui est conservée durant environ 12 heures à la chambre froide . Le précipité de protéines qui s'est formé est éliminé par centrifugation à faible vitesse et la suspension virale est centrifugée pendant 3 heures à 30 000 t/mn, dans le rotor 30 de la centrifugeuse Beckman L2 65 B . Les culots de virions sont recouverts d'eau distillée . Après remise en suspension des particules virales, on effectue de nouveau une centrifugation à faible vitesse ; les virions sont sédimentés par centrifugation à 50 000 t/mn dans le rotor 50 Ti pendant une heure . Les culots de virions sont finalement repris par un petit volume d'eau distillée . Le surnageant de cette dernière centrifugation contient encore du virus en quantité appréciable et peut être utilisé pour la préparation d'une suspension virale destinée à l'inoculation de plants .

La concentration de la suspension virale ainsi obtenue, de l'ordre de quelques dizaines de mg/ml, est déterminée en mesurant la densité optique, à 260 nm, d'une dilution de la solution initiale (Fig. 2) . Le coefficient d'extinction du VMJN à 260 nm, est de 89 (pour une solution à 10 mg/ml et un trajet optique de 1 cm) . (HASELKORN, 1962) .

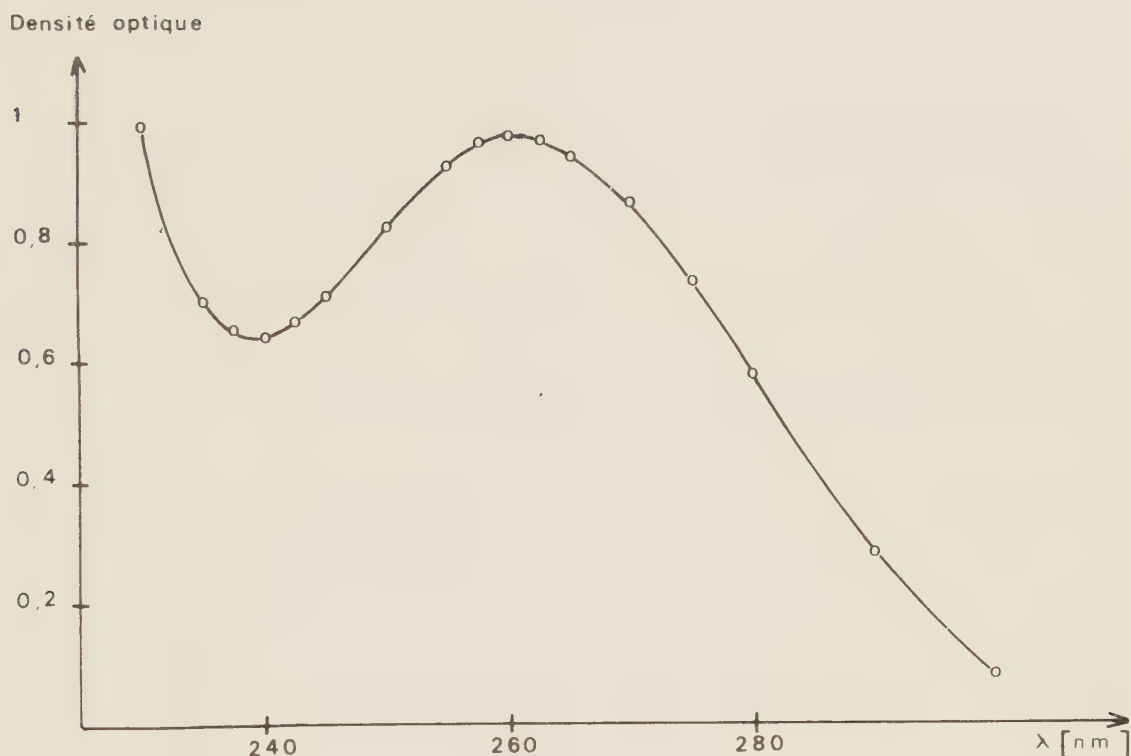


Figure 2 - Spectre d'absorption du VMJN en solution dans l'eau .
Ce spectre a été obtenu point par point, à l'aide d'un spectrophotomètre
Zeiss PM QII . Le trajet optique est de 1 cm .

Les solutions de VMJN sont conservées au réfrigérateur , à une température supérieure à 0 °C . En effet, KAPER a montré que la congélation d'une suspension virale provoque la dégradation des virions et la libération des molécules de RNA et il propose précisément d'utiliser des cycles de congélation-décongélation comme méthode de préparation de l'acide nucléique (KAPER et SIBERT, 1969) .

II - 2 - PREPARATION DU RNA DU VMJN

Le RNA est extrait des virions fraîchement purifiés par la méthode

de GIERER ET SCHRAMM (1956) en présence de pronase (HUPPERT et SEMMAL, 1965).

La concentration de la solution de virions, dans l'eau, est de 10 à 20 mg/ml . On amène cette suspension en milieu tris 0,1 M, pH 7,4 par addition de tris molaire . On y ajoute une solution de pronase, préparée la veille, jusqu'à la concentration finale de 2 mg/ml . Ce mélange est incubé pendant deux heures à 37°C, afin d'hydrolyser certaines impuretés protidiques, dont les RNases éventuellement encore présentes dans la suspension virale .

Après incubation, on ajoute à la solution deux volumes de phénol distillé sous azote et saturé d'eau, et on agite lentement à la main, pendant 15 mn . En effet, si l'agitation est trop violente, le RNA obtenu est polydisperse . L'émulsion est rompue par centrifugation à faible vitesse et la phase aqueuse prélevée . Après une seconde extraction au phénol saturé, l'acide nucléique est précipité par deux volumes d'éthanol froid . On peut augmenter le rendement de la préparation en reprenant les deux phases phénoliques par de l'eau saturée de phénol .

Le précipité de RNA sous alcool est laissé au moins deux heures au congélateur, puis recueilli par centrifugation à faible vitesse, séché sous vide et repris dans un tampon tris 10^{-2} M, pH 7 . Le RNA est de nouveau précipité à l'alcool, ce qui permet d'éliminer en partie le phénol contaminant, puis remis en suspension dans le même tampon .

Les quantités d'acide nucléique ainsi préparées étant relativement importantes, de 50 à 100 mg par préparation, le RNA est mis en réserve pour être utilisé au fur et à mesure des besoins . Deux procédés nous ont paru satisfaisants : le RNA peut être conservé soit sous forme de précipité dans l'alcool à 66 %, à -20°C, soit congelé par petites fractions, sous forme de solution aqueuse . Dans ce dernier cas, l'échantillon de RNA est toujours utilisé immédiatement après avoir été décongelé .

II - 3 - PREPARATION DES RNA RIBOSOMAux

Dans les expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, on utilise comme témoin de migration, les RNA ribosomiaux de E. coli, dont les propriétés sont relativement bien connues . Ces RNA ont été préparés selon la méthode suivante .

II - 3 - 1 - CULTURE DES BACTERIES

Les bactéries étant destinées à la préparation de RNA, nous avons utilisé, pour limiter les problèmes posés par les nucléases, une souche RNase I⁻, MRE 600, de Escherichia coli . Ces bactéries sont cultivées sur une table à agitation rapide, dans le milieu suivant, à 37°C :

NH ₄ CL	1 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
Na ₂ H PO ₄	5,5 g/l
Mg SO ₄	0,13 g/l
Glucose	2 g/l

En fin de phase de croissance exponentielle, les bactéries sont récoltées par centrifugation du milieu de culture à l'aide d'une centrifugeuse continue SHARPLES, type T4T .

II - 3 - 2 - PREPARATION DES RIBOSOMES

La pâte bactérienne est broyée, en présence d'un poids égal d'alumine (Alcoa, Bactériological grade A-303) (MATTHACI et NIRENBERG, 1961) au froid . Après addition de tampon tris 10⁻²M, pH 7,4, MgCL₂ 10⁻²M, β-ME 0,5 ml/l) , et homogénéisation, l'alumine, les bactéries non broyées et les plus gros débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 20mm à 13 000 t/mm . Le surnageant est traité à la DNase à 0,1 mg/ml, puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions . Le nouveau surnageant est

centrifugé pendant 90 mn à 50 000 t/mn et les culots de ribosomes sont recouverts par quelques ml de tampon (tris 10^{-2} M, pH 7,4, NH_4Cl $3 \cdot 10^{-2}$ M, MgCl_2 10^{-2} M, β ME $6 \cdot 10^{-3}$ M) .

II -3 - 3 - EXTRACTION DES RNA RIBOSOMAux

On extrait tous les RNA contenus dans les ribosomes : fraîchement préparés , selon la méthode préconisée par TRAUB et coll.(1971) .

A un volume de suspension de ribosomes, on ajoute 0,2 volume de bentonite à 2 mg/ml, 0,5 volume de lauryl sulfate de sodium (SDS) à 10 % et un volume de tampon 1 SSC - EDTA (Na Cl 0,15M, citrate de sodium 0,015M, EDTA 0,01 M, pH 7,0) . Après 5 mn d'incubation à 0°C, avec agitation, on procède à deux extractions au phénol successives . Les RNA sont ensuite précipités à l'éthanol puis remis en suspension dans un petit volume de tampon 1 SSC - EDTA, de nouveau précipités à l'alcool et finalement remis en solution dans un tampon 1 SSC .

Les RNA ribosomaux ainsi préparés sont conservés à -20°C, congelés par petites fractions .

- CHAPITRE III -

PROPRIETES DU RNA DU VMJN

Afin de vérifier la qualité du RNA du VMJN isolé selon la méthode décrite, nous avons caractérisé les préparations du RNA viral en utilisant différentes méthodes : absorption dans l'ultra-violet, ultracentrifugation analytique, électrophorèse sur gel de polyacrylamide . D'autre part, pour avoir un point de comparaison lors de l'interprétation de la dégradation du RNA bicaténaire, que nous exposerons par la suite, nous avons également étudié l'effet de la chaleur et de l'EDTA sur le RNA viral .

III - 1-CARACTERISATION DU RNA VIRAL

III - 1 - 1 - SPECTRE D'ABSORPTION

Le spectre d'absorption du RNA du VMJN, dans le domaine de longueur d'onde s'étendant de 220 à 300 nm, présente, comme celui de tous les acides nucléiques, un minimum d'absorption à 232 nm et un maximum à 260 nm (Fig. 3) .

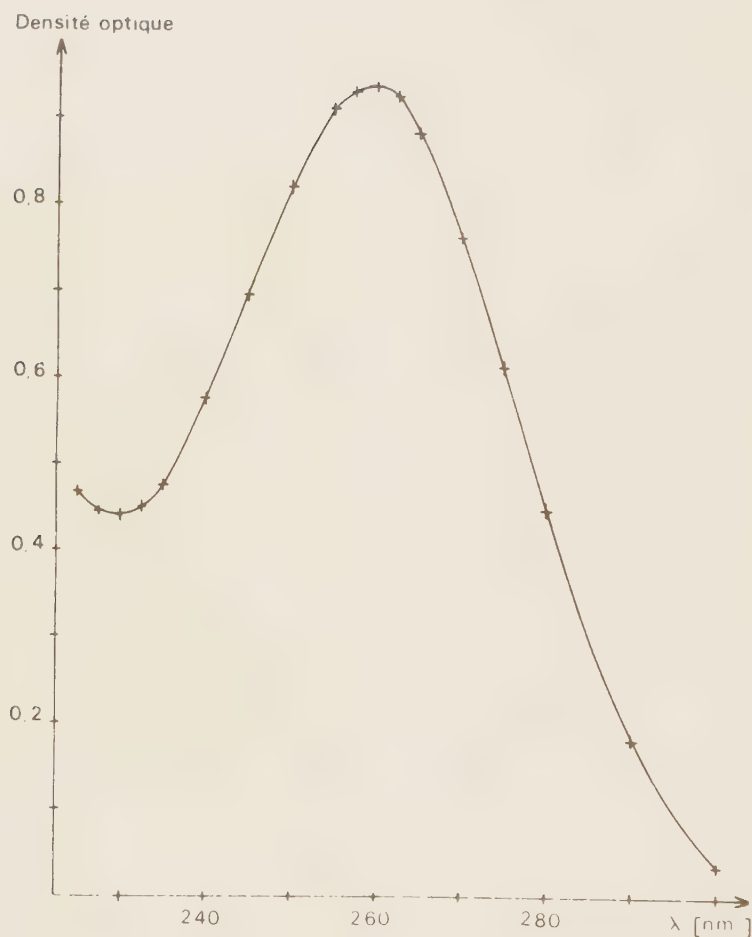


Figure 3 : Spectre d'absorption du RNA du VMJN, en solution dans un tampon tris $10^{-2}M$, pH 7,4 . Ce spectre a été obtenu point par point à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PMQII . Le trajet optique est de 1 cm .

Pour chaque préparation, on a déterminé les rapports entre les absorptions respectives à 260 et 232 nm d'une part, 260 et 280 nm d'autre part . Pour la préparation dont le spectre est représenté sur la figure 3, on obtient :

$$\frac{\text{D. O. à 260 nm}}{\text{D. O. à 232 nm}} = 2,15$$

$$\frac{\text{D. O. à 260 nm}}{\text{D. O. à 280 nm}} = 2,10$$

Ces valeurs sont caractéristiques des RNA .

La concentration des solutions de RNA est calculée à partir de leur densité optique à 260 nm, le coefficient d'extinction du RNA étant de 22 (en mg par ml) (HIRTH et coll., 1965) .

III - 1 - 2 - ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Le coefficient de sédimentation est un paramètre important et caractéristique d'une espèce moléculaire, dans un environnement donné . Aussi, l'ultracentrifugation analytique constitue-t-elle une bonne méthode de caractérisation d'une solution de macromolécules, et toutes les préparations de RNA viral ont été contrôlées par cette technique .

Les conditions d'utilisation de l'ultracentrifugeuse analytique pour la détermination du coefficient de sédimentation du RNA du VMJN généralement sont les suivantes : vitesse de rotation de 48 000 t/mm, température de 5°C et concentration en RNA de 20 à 40 µg/ml, ce qui correspond à une densité optique à 260 nm de 0,4 à 0,8 environ . De plus, le RNA est en solution dans un tampon tris 10^{-2} M, pH 7,4 . Enfin, le coefficient de sédimentation ainsi déterminé est ramené aux conditions standard, correspondant à un solvant ayant la viscosité et la densité de l'eau à 20°C, à l'aide de la relation classique de SVEDBERG et PEDERSEN .

Examinons les résultats obtenus . En premier lieu, comme le montre la figure 4, les préparations de RNA viral apparaissent relativement mono-

disperses, avec cependant une faible proportion de matériel hétérogène totalisant 5 à 15 % selon les préparations et ayant un faible coefficient de sédimentation .

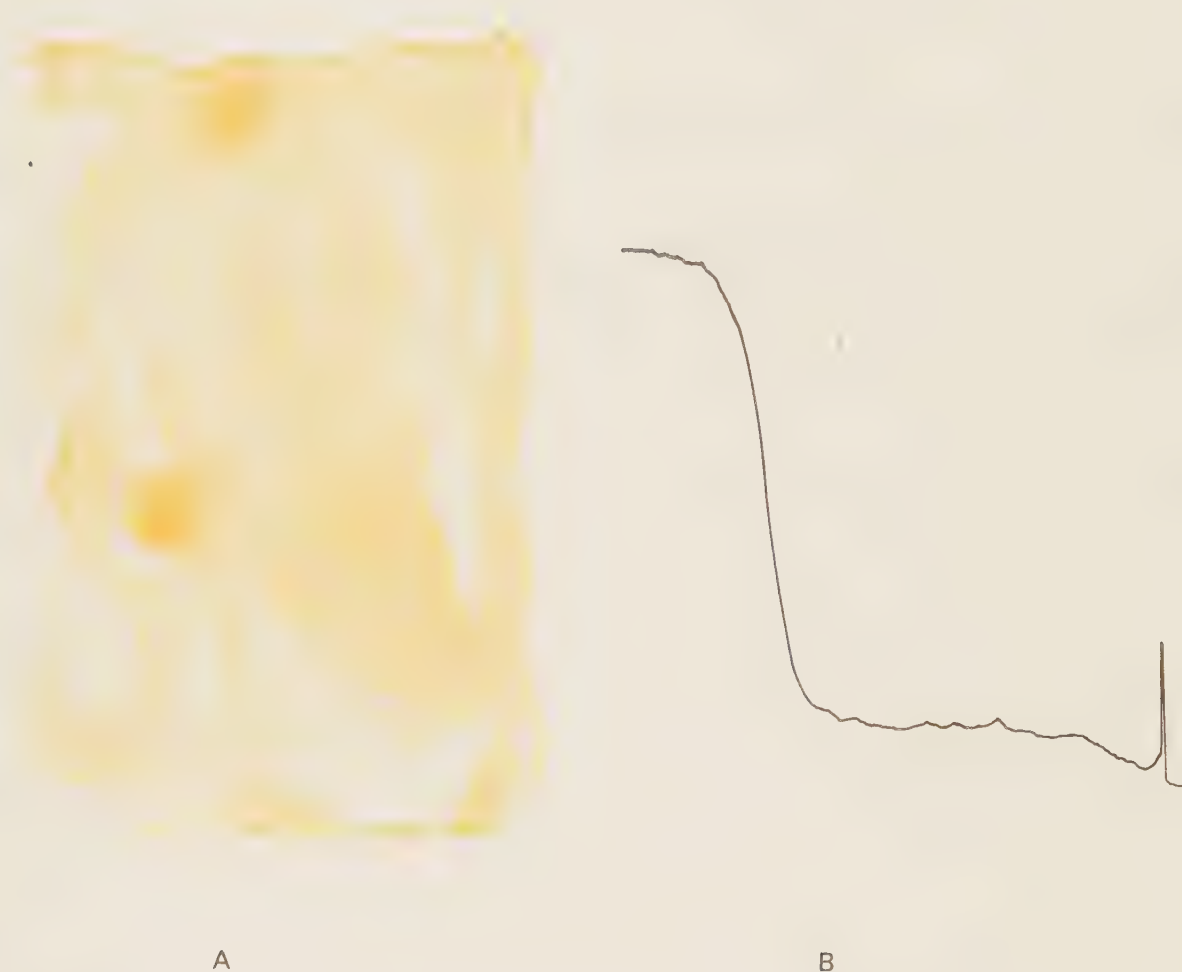


Figure 4 - Ultracentrifugation analytique de RNA du VMJN en solution dans un tampon tris $10^{-2}M$, pH 7,4, à la concentration de 30 $\mu g/ml$. La vitesse de rotation est de 48 000 t/mn et la température du rotor de 20 °C .
A. Photographies de la cellule prises toutes les 4 mn (temps de pose : 15 sec.)
B. Microdensitométrie de la photographie obtenue après 30 mn de centrifugation

Les valeurs du coefficient de sédimentation du RNA viral en solution dans le tampon tris 10^{-2} M, et à une concentration inférieure à 40 µg/ml, sont comprises entre 23 et 25 S. Dans ces conditions, on n'observe pas de variation systématique de ce paramètre avec la concentration, car les différences entre les valeurs de s auxquelles on pourrait s'attendre sont inférieures aux erreurs expérimentales.

D'autre part, le coefficient de sédimentation du RNA du VMJN, ainsi d'ailleurs que sa viscosité intrinsèque, dépendent fortement de la nature du solvant, et plus particulièrement de la force ionique de celui-ci (HIRTH et coll. 1965, DUPONT et HORN 1968). Ainsi, si le RNA est en suspension dans un tampon phosphate, 10^{-1} M, la valeur de ce paramètre est de 28 S. Afin de travailler dans des conditions reproductibles, nous déterminerons toujours le coefficient de sédimentation du RNA viral dans le même milieu, le tampon tris 10^{-2} M, pH 7,4, et dans le même domaine de concentration.

III - 1 - 3 - ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Enfin, les préparations de RNA viral ont été également caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette technique présente quelques avantages sur la centrifugation analytique : mise en oeuvre plus simple, traitement des résultats plus facile, meilleur pouvoir de résolution et possibilité de traiter simultanément un nombre relativement important d'échantillons. Elle est particulièrement intéressante pour l'analyse de mélanges de différents acides nucléiques.

- Mode opératoire :

Les gels de polyacrylamide sont préparés par copolymérisation d'acrylamide ($\text{NH}_2\text{-CO-CH-CH}_2$) et N - N - méthylène bisacrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH} = \text{CH}_2$), selon la méthode préconisée par LOENING (1967, 1968). Les monomères utilisés (acrylamide : APELAB, bisacrylamide : SERVA, pur) sont recristallisés respectivement dans le chloroforme et dans l'acétone. Cette purification est nécessaire, car les produits commerciaux contiennent des inhibiteurs de polymérisation, ce qui est particulièrement gênant lorsqu'on utilise, comme nous le faisons, des gels très peu concentrés.

A 75 ml d'une solution contenant :

acrylamide :	2 % (poids/volume)
bisacrylamide :	0,1 % (poids/volume)
tris	36 mM
Na H ₂ PO ₄	30 mM
EDTA	1 mM

et dégazée brièvement sous vide, on ajoute 50 µl de N,N,N',N' - tetraméthyl, éthylène diamine (TEMED) et 0,5 ml de persulfate d'ammonium à 10 % fraîchement dissous, qui initient la polymérisation . Le mélange est rapidement versé dans des tubes de plastique cylindriques, de 7 mm de diamètre, fermés par une membrane parafilm . A température ambiante, au bout d'une heure, la polymérisation est achevée ; les tubes sont retournés afin que la face supérieure du gel soit plane, la partie inférieure du gel est coupée de façon à ce qu'il ait une longueur de 9 cm . Le tube est fermé par une membrane à dialyse . De nombreux auteurs, utilisant des gels à 2 ou 2,5 % d'acrylamide y ajoutent 0,5 % d'agarose de façon à augmenter leur solidité et faciliter leur manipulation . L'inconvénient de cette méthode tient au fait que les gels ainsi préparés absorbent notablement la lumière ultra-violette, ce qui nuit à la qualité du dépouillement des expériences . C'est pourquoi, nous avons préféré ne pas employer d'agarose, les gels à 2 % d'acrylamide étant encore assez solides pour pouvoir être manipulés avec précaution .

Outre les composés indiqués ci-dessus (tris, EDTA et phosphate), le tampon d'électrophorèse contient 2 g/l de SDS, qui permet d'inhiber l'action d'éventuelles nucléases . Comme l'acrylamide, le SDS est recristallisé avant emploi . Les gels sont utilisés immédiatement après avoir été préparés, sans avoir été gonflés dans le tampon d'électrophorèse comme le préconisent certains (BISHOP et COLE, 1967). Ils subissent simplement une préélectrophorèse d'une heure, afin d'éliminer les catalyseurs et éventuellement les monomères qui présentent une absorption importante dans l'UV.

On dépose sur chaque gel, 20 à 200 µl de solution d'acides nucléiques contenant 5 à 10 % de saccharose, et sur l'un des gels, 10 µl de bleu de bromophénol à 0,1 %, qui permet de suivre l'avancement de l'électrophorèse et peut servir de marqueur . Selon les expériences, l'électrophorèse dure de 3 à 6 heures, avec un courant de 8 mA par gel ce qui correspond à une

différence de potentiel de 70 volts environ .

Après électrophorèse, les gels sont extraits des tubes et placés dans la cuve en quartz d'un analyseur de gel (Polyfrac, Joyce Loeb1) . On enregistre ainsi la densité optique du gel, à la longueur d'onde de 265 nm, en fonction de la distance .

- Résultats :

La figure 5 (A, B, C) reproduit les enregistrements de la densité optique des gels sur lesquels ont été déposé respectivement des RNA ribosomaux de E. Coli, du RNA du VMJN et du RNA du VMT . On peut noter que le pic correspondant au RNA viral est plus large que ceux correspondant aux RNA ribosomaux . Les valeurs respectives des mobilités des différents types de RNA, calculées en affectant la valeur 1 au RNA ribosomal 16 S, sont portées sur le tableau suivant :

RNA	rRNA - 16S	rRNA - 23S	RNA-VMT	RNA-VMJN
Mobilité	1	0,761	0,456	0,348

Les résultats des expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sont souvent utilisés pour déterminer la masse moléculaire d'un RNA inconnu . En effet,, si différents RNA ont des structures tertiaires semblables, leur mobilité, au cours de l'électrophorèse, est proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire . Il suffit donc de porter, sur un graphique, la mobilité des différents RNA témoins en fonction de Log M ; les points correspondants doivent être alignés et on peut obtenir la masse moléculaire du RNA inconnu à partir de sa mobilité électrophorétique . Cependant, cette méthode appelle plusieurs remarques .

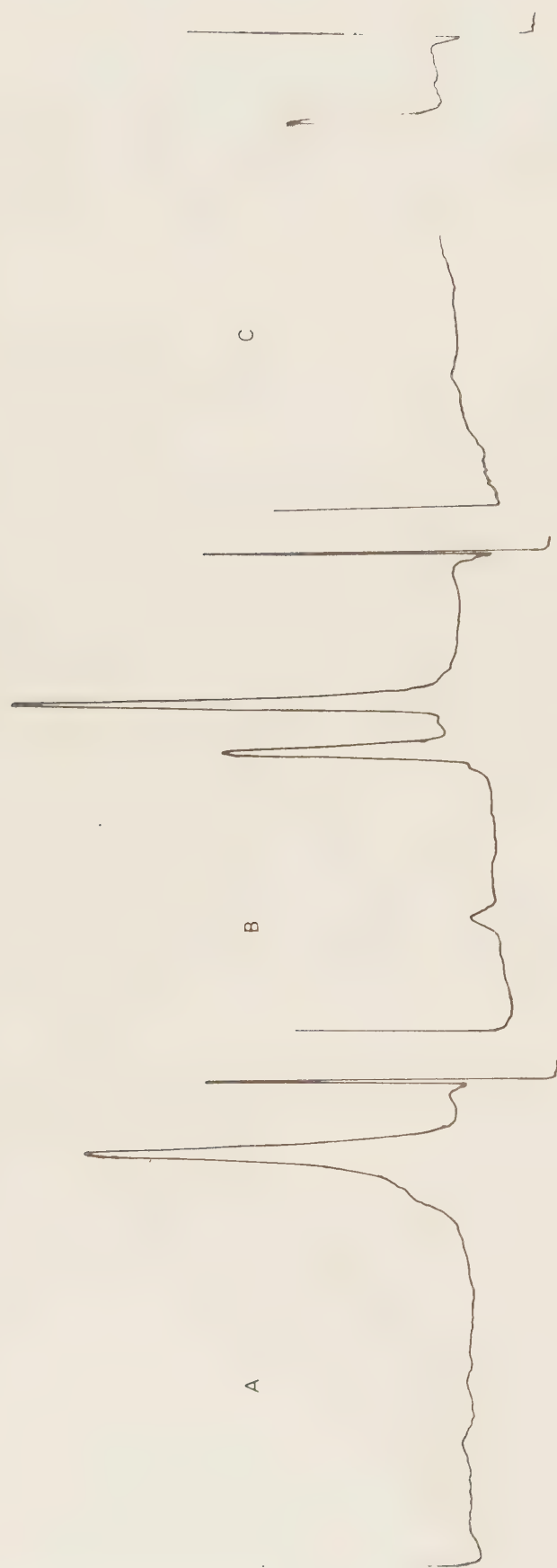


Figure 5 - Electrophorèse de RNA sur gel de polyacrylamide à 2 % . Enregistrement de l'absorption des gels à 265 nm .

A. RNA du VMJN

B. RNA ribosomaux de E. Coli

C. RNA du VMT

En premier lieu, il n'y a que relativement peu de RNA dont la masse moléculaire ait été établie rigoureusement . Ainsi, ce sont les RNA ribosomaux de E. Coli, 16 S et 23 S qui sont le plus souvent utilisés comme témoins d'électrophorèse . Or, la valeur attribuée à la masse moléculaire du RNA 16 S est controversée . On admet généralement qu'elle est de $5,7.10^5$ daltons (KURLAND, 1960, STANLEY ET BOCK, 1965, MIDGLEY , 1965) . Or, des mesures récentes de ce paramètre, par équilibre de sédimentation, conduisent à la valeur de $6,4.10^5$ (ORTEGA et HILL, 1973) . La différence entre les résultats obtenus par STANLEY et ORTEGA, qui emploient tous deux la même méthode, vient de l'estimation du volume spécifique partiel du RNA .

D'autre part, il est certain que tous les RNA n'ont pas la même structure tertiaire, c'est-à-dire que l'encombrement de la molécule ne dépend pas que de sa masse . Nous avons soumis à l'électrophorèse des RNA dont la masse moléculaire a été déterminée par d'autres techniques : RNA ribosomaux de E. Coli , RNA du VMJN, RNA du VMT . Si l'on porte sur un graphique Log M, en fonction de la mobilité, on constate que les points correspondant aux RNA ribosomaux et au RNA du VMT sont alignés, à condition que l'on prenne pour la masse moléculaire du RNA 16 S, la valeur déterminée par ORTEGA, $6,4.10^6$ (Fig. 6) . Par contre, le point correspondant au RNA du VMJN ne se trouve pas sur cette droite et l'écart ne peut s'expliquer par les erreurs expérimentales . On peut noter d'ailleurs que le RNA du VMJN migre moins que le RNA du VMT qui aurait pourtant la même masse moléculaire . Ce fait est à rapprocher de la différence qui existe entre les coefficients de sédimentation respectifs de ces deux RNA .

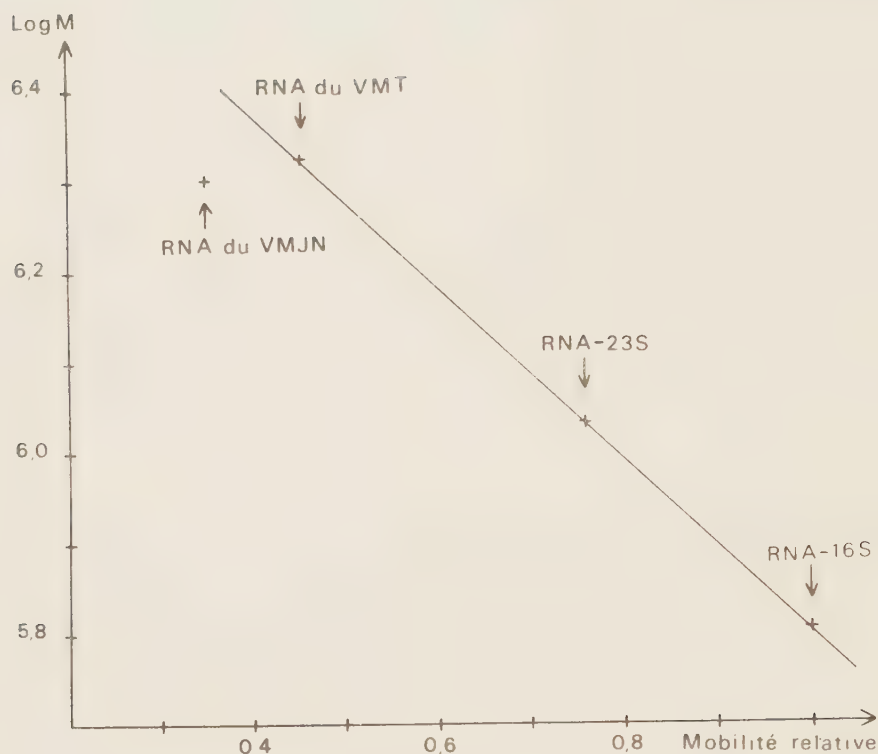


Figure 6 - Electrophorèse de RNA sur gel de polyacrylamide à 2 % . Mobilité relative de différents RNA en fonction du logarithme de leur masse moléculaire . (on a donné la valeur 1 à la mobilité du RNA 16S)

- Influence de la quantité de RNA déposée sur le gel :

Notons qu'il n'est pas possible de déposer une grande quantité de RNA du VMJN sur un gel de polyacrylamide . En effet, nous avons déposé sur une série de gels des quantités croissantes de RNA du VMJN et de RNA ribosomaux de E. Coli . Après électrophorèse, les gels ont été densitométrés et nous avons mesuré les aires, $A(m)$, comprises entre la ligne de base et les pics correspondant aux RNA . Sur la Fig. 7, nous avons porté l'aire du pic de RNA en fonction de la masse de RNA déposée sur le gel . On remarque que, dans le cas des RNA ribosomaux, dans la limite des mesures effectuées,

$A(m)$ est proportionnelle à la quantité de RNA déposé . Par contre, dans le cas du RNA du VMJN, il n'y a proportionnalité que pour une masse de RNA déposée, inférieure à $30 \mu\text{g}$.

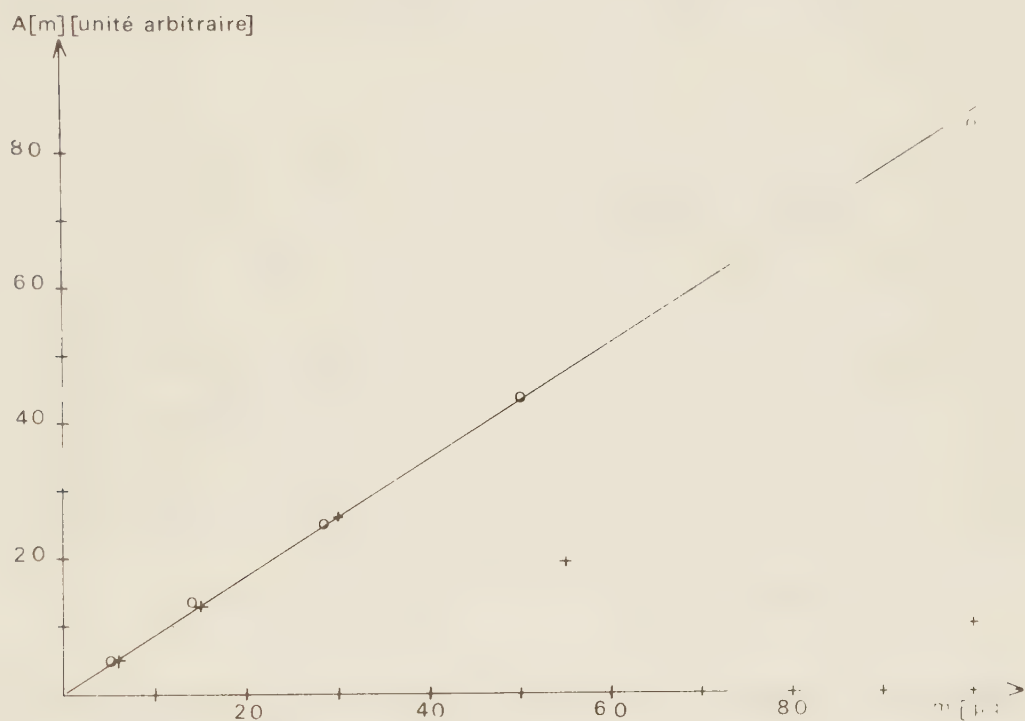


Figure 7 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide : relation entre la masse de RNA déposée sur le gel et l'aire du pic correspondant .

o RNA ribosomiaux de E. Coli

+ RNA du VMJN

On observe d'ailleurs, que lorsqu'on dépose une grande quantité de RNA viral, le sommet du gel est fortement déformé . C'est pourquoi, on a toujours déposé sur les gels de polyacrylamide des quantités de RNA du VMJN inférieures à $30 \mu\text{g}$.

III - 2 - ACTION DE L'EDTA SUR LE RNA DU VMJN

Il était admis que les préparations de RNA du VMJN sont dégradées par l'EDTA, agent complexant les ions métalliques divalents, l'effet maximum étant obtenu pour une concentration d'EDTA de 10^{-3} M (STRAZIELLE et Coll, 1965) . Comme les tampons que nous utilisons, en particulier lors des expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, contiennent de l'EDTA à cette concentration et que nous n'avons pas , alors, observé d'effet sur le RNA viral, nous avons étudié ce problème plus en détail . Le RNA traité par l'EDTA a été analysé par ultracentrifugation analytique, centrifugation de bande en gradient de saccharose, et électrophorèse sur gel de polyacrylamide .

III - 2 - 1 - MODE OPERATOIRE

Pour réaliser ces expériences, on utilise des solutions de RNA viral à la concentration de 30 $\mu\text{g/ml}$ environ, en milieu tris 10^{-2} M, pH 7,4 et qui contiennent également 2 mg/ml de bentonite afin d'inhiber les nucléases éventuellement présentes . A ce mélange, on ajoute différentes quantités d'EDTA, jusqu'à des concentrations finales de 5.10^{-5} M à 10^{-2} M . Après 30 mn à température ambiante, le RNA est analysé .

La bentonite (BDH, qualité technique) est préparée selon la méthode de BUNN et HITCHBORN (1965) qui permet d'obtenir des suspensions dont les particules sont de taille relativement homogène et en particulier d'éliminer les particules les plus fines . La concentration des suspensions de bentonite est obtenue par détermination du poids sec .

III - 2 - 2 - RESULTATS

Avant de poursuivre cette étude, il nous est apparu nécessaire de vérifier que l'EDTA n'est pas adsorbé par la bentonite . Pour cela, nous préparons des suspensions de bentonite, contenant différentes concentra-

tions d'EDTA : 10^{-2} , 10^{-3} , et 10^{-4} M . Ces suspensions sont centrifugées pendant 20 mn à 15 000 t/mn de façon à sédimenter la bentonite . Nous dosons ensuite l'EDTA dans le surnageant par le sel ferrique (CHARLOT , 1961) . Dans tous les cas, nous n'observons aucune variation de la concentration d'EDTA dans les solutions . L'EDTA reste donc bien en solution et n'est pas adsorbé par la bentonite .

- Ultracentrifugation analytique :

La présence de bentonite ne perturbe pas les mesures de coefficient de sédimentation du RNA viral . En effet, les particules de bentonite sédimentent très rapidement . Nous avons d'ailleurs comparé le coefficient de sédimentation du RNA du VMJN, en milieu tris 10^{-2} M, en présence de bentonite à 2 mg/ml et en l'absence de bentonite, les résultats sont identiques :

Avec bentonite : $S_{20,W} = 23,5$

Sans bentonite : $S_{20,W} = 23,3$

Le résultat essentiel de cette étude réside dans le fait que la centrifugation analytique ne permet pas de mettre en évidence une dégradation du RNA viral par l'EDTA . Les valeurs du coefficient de sédimentation du RNA du VMJN en présence de différentes quantités d'EDTA sont reportées sur le tableau suivant

C. EDTA (M)	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
S_{20W}	23,3	21,8	22,5	21,5	23,2

On peut exprimer l'erreur relative commise lors de la détermination du coefficient de sédimentation dans les conditions standard par la relation suivante :

$$\frac{\Delta S_{20,w}}{S_{20,w}} = 2 \frac{\Delta \omega}{\omega} + \frac{\Delta \frac{d \log r}{dt}}{\frac{d \log r}{dt}} + \frac{\Delta \eta}{\eta}$$

La précision avec laquelle on connaît la viscosité η du solvant est essentiellement liée à l'appréciation de la température du rotor qui est connue à 0,5°C près, ce qui entraîne une erreur de 1,2 % sur la viscosité . Si on admet par ailleurs une erreur de 0,5 % sur la vitesse de rotation ω et de 2 % sur la pente de la droite $L \log r(t)$, on peut estimer que la valeur de $S_{20,w}$ est connue à 4,2 % près .

Les écarts observés entre les différentes valeurs de s sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales . De plus, l'examen des courbes de densitométrie des clichés de sédimentation, ne révèle pas d'augmentation sensible de la polydispersité des solutions de RNA viral après traitement par l'EDTA .

- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

Parallèlement, nous avons analysé le RNA du VMJN traité par l'EDTA en présence de bentonite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide . Dans ces expériences, la présence de bentonite dans les échantillons de RNA n'est pas gênante car les particules de bentonite ont des dimensions trop importantes pour qu'elles puissent pénétrer dans les gels . D'autre part, nous avons

utilisé un tampon d'électrophorèse de même composition que celle indiquée précédemment, mais sans EDTA .

200 μ l de solution, contenant 8 μ g de RNA, ont été déposés, après traitement par l'EDTA, sur des gels à 2 % d'acrylamide et soumis à électrophorèse . Les profils des gels correspondants sont indiqués sur la Fig. 8

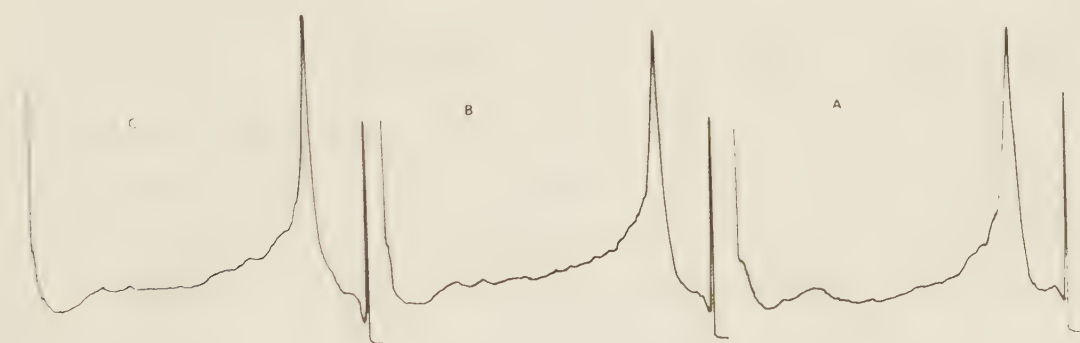


Figure 8 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de RNA du VM₂₁N après traitement à l'EDTA .

A. Pas d'EDTA

B. Concentration en EDTA : 10^{-3} M

C. Concentration en EDTA : 10^{-2} M

Comme les expériences de centrifugation, l'électrophorèse ne révèle aucune action de l'EDTA sur le RNA viral . En effet, quelle que soit la concentration en EDTA (de 10^{-7} à $5 \cdot 10^{-2}$ M), la distance de migration électrophorétique du RNA reste la même et le profil du pic de RNA ne subit aucune modification : il est identique à celui correspondant au RNA non traité .

Notons aussi que la durée du traitement, ainsi que la température à laquelle il est effectué, n'ont pas d'influence sur le résultat obtenu . Ainsi nous avons analysé des préparations de RNA traitées pendant des temps compris entre 30 mn et 8 heures, à 37°C, ou pendant 30 mn à 20,35 et 60°C . Le comportement du RNA, en électrophorèse, reste toujours le même, sauf si le traitement est effectué à 60°C . Dans ce dernier cas, on observe la dégradation d'une très faible proportion du RNA, ce qui se traduit par un élargissement de la bande de RNA dans le gel . Mais, à la température de 60°C, on observe le même effet quelle que soit la concentration en EDTA . Ce résultat est donc dû à l'action de la chaleur et non à la présence de l'EDTA .

- Sédimentation de bande en gradient de saccharose :

Enfin, le RNA viral traité par l'EDTA a été analysé également par centrifugation en gradient de saccharose . Nous utilisons des gradients linéaires 5 - 20 %, préparés dans les tubes du rotor S W 40 de la centrifugeuse Beckman L2 65B . Après traitement par l'EDTA, 0,8 ml d'échantillon, soit environ 200 µg de RNA sont déposés sur chaque gradient . La centrifugation (15 heures à 24 000 t/mn) est effectuée à la température de 4°C . Lorsque la centrifugation est terminée, les gradients sont analysés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DK2 équipé d'une cuve à circulation .

La Fig. 9 donne un exemple d'enregistrement de la densité optique à 260 nm le long du gradient . Cette méthode ne nous permet pas non plus de mettre en évidence un effet quelconque de l'EDTA sur le RNA viral .

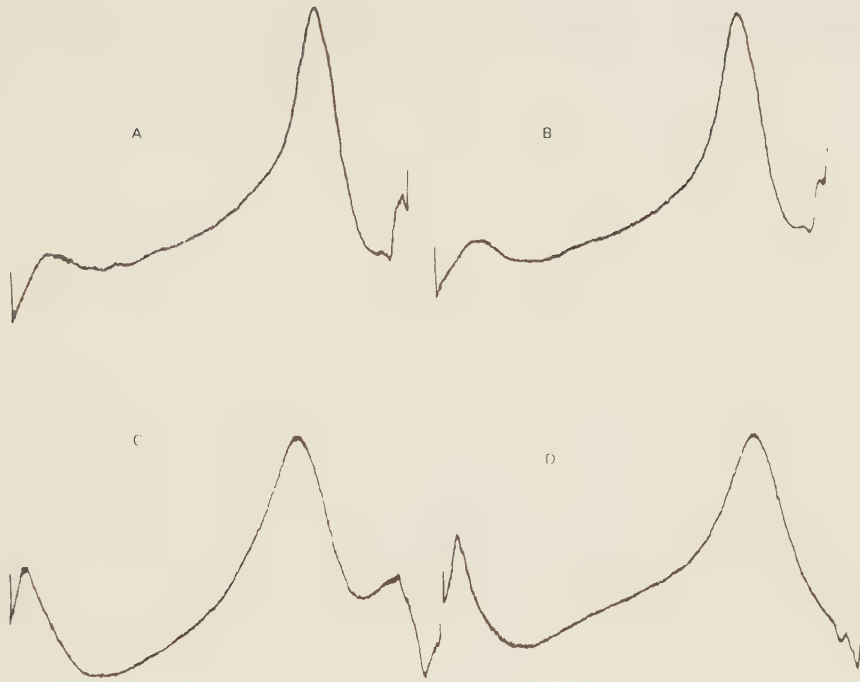


Figure 9 - Centrifugation de bande en gradient de saccharose 5 - 20 % du RNA du VMJN après traitement à l'EDTA .
Enregistrements de la densité optique à 255 nm après 15 heures de centrifugation à 24 000 t/mn et à 4°C .

A. Pas d'EDTA

B. Concentration en EDTA : 10^{-3} M

C. Pas d'EDTA

D. Concentration en EDTA : 10^{-2} M

En résumé, aucune des différentes méthodes d'analyse utilisées, ultracentrifugation analytique, électrophorèse sur gel de polyacrylamide, centri-

fugation en gradient de saccharose, n'a permis de mettre en évidence d'effet spécifique de l'EDTA sur le RNA du VMJN . On obtient les mêmes résultats, quelle que soit la concentration en EDTA, de 10^{-7} à 10^{-2} M, la durée du traitement ou la température à laquelle il est effectué .

III - 3 - ACTION DE LA CHALEUR SUR LE RNA DU VMJN

Comme nous étudierons par la suite l'action de la chaleur sur le RNA bicaténaire, il nous a semblé important d'étudier également le comportement du RNA viral dans des conditions comparables . On a montré que le RNA du bactériophage R 17 se dégrade très lentement à la température de 70°C (GESTERLAND, 1964) .

En ce qui concerne le RNA du VMJN, des résultats plus anciens indiquaient que ce RNA est dégradé rapidement à 60°C (HASELKORN, 1962) . Nous avons repris ces mesures en étudiant, non pas l'évolution du RNA en fonction du temps à une température donnée, mais l'état du RNA après passage, pendant un temps déterminé, à différentes températures .

Les solutions de RNA du VMJN, dans un tampon tris 10^{-2} M, pH 7,4, à la concentration de 100 µg/ml environ, sont placées durant 10 mn à différentes températures . Après incubation, la solution de RNA est refroidie brusquement par immersion des tubes dans la glace, puis le RNA est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide .

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants . Jusqu'à la température de 60°C, le RNA n'est absolument pas dégradé et le profil d'électrophorèse correspondant est identique à celui du RNA non traité (Fig. 10 A - B). A partir d'une température supérieure, on observe en plus du pic principal de RNA, un peu de matériel migrant plus rapidement . Au fur et à mesure que la température de traitement augmente, l'aire du pic correspondant au RNA intact diminue et la quantité de matériel migrant plus vite que le RNA viral augmente, comme on peut le voir sur la Fig. 10 (C et D) .

On peut remarquer que, même pour une température de traitement de 100°C, on observe encore une faible quantité de RNA migrant avec la même mobilité que le RNA viral non traité .

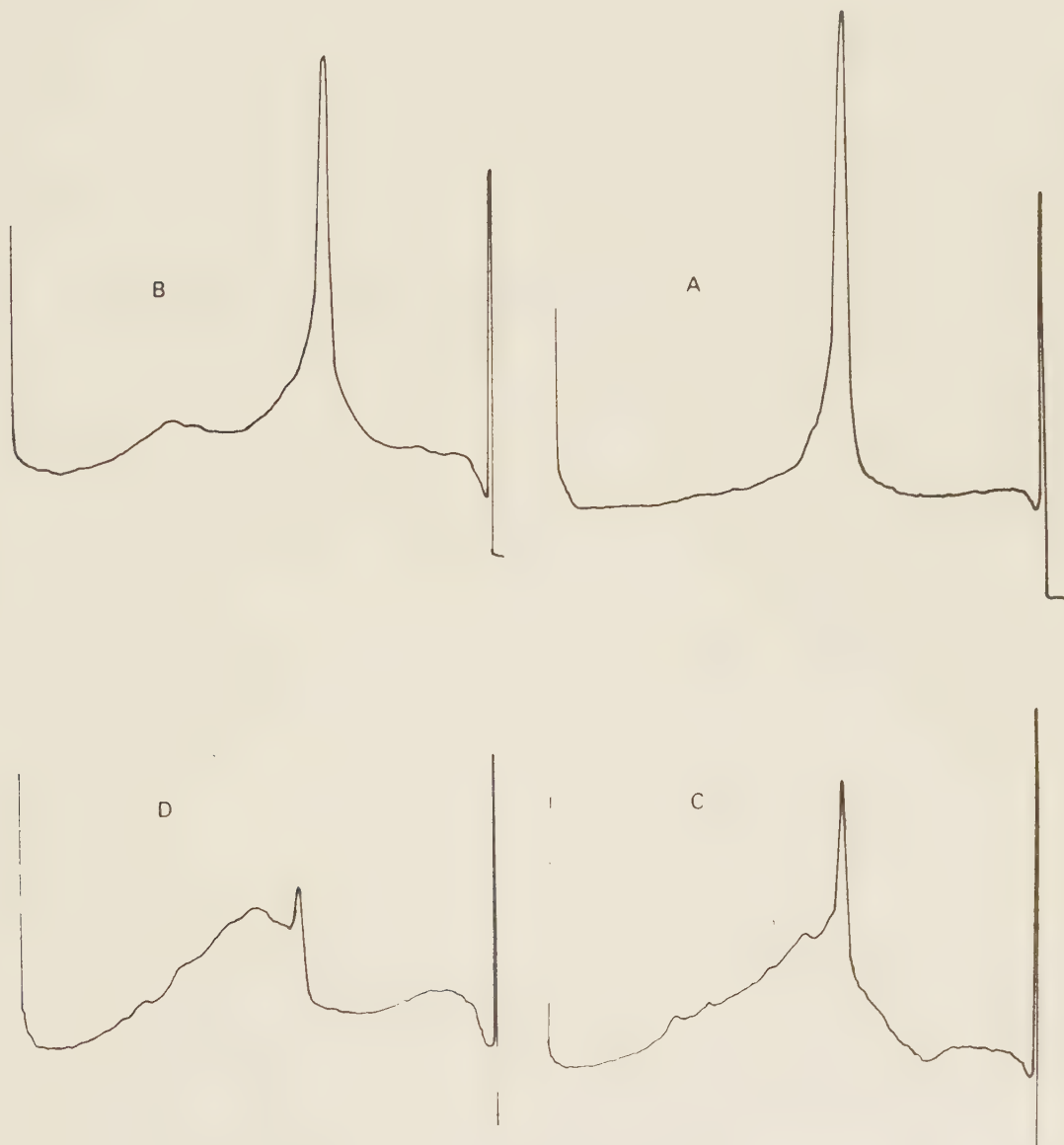


Figure 10 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide du RNA du VMJN après traitement thermique :

A. Température ambiante

B. 10 mn à 60°C

C. 10 mn à 70°C

_ CHAPITRE IV _

PREPARATION DU RNA BICATENAIRE

Le RNA bicatenaire étudié est extrait de feuilles de chou de Chine (*Brassica chinensis*, Var. Wong Bock) infectées par le virus de la mosaïque jaune du navet selon la méthode décrite précédemment (BOVE, 1967 - LAFLECHE et al., 1972) . Ce RNA est caractéristique de l'infection virale et ne peut être mis en évidence dans les plantes saines .

IV - 1 - INOCULATION DES PLANTES

Pour effectuer cette préparation, on utilise des plantes infectées selon la méthode décrite lors de l'étude du RNA viral .

IV - 2 - EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

Les feuilles de la rosette, qui poussent après l'infection, sont récoltées au bout de trois à quatre semaines. Les pétioles et les nervures centrales sont enlevés. Après lavage à l'eau distillée froide et essorage, les feuilles sont broyées en présence de tampon TB 7,4 (tris 0,05M, pH 7,4, $MgCl_2$ 0,008M, β M.E 0,009M), à raison de 120 ml pour 60 g de feuilles. Ce traitement est effectué dans un broyeur TURMIX. Il a été vérifié que 60 secondes de fonctionnement à vitesse maximale donnent le meilleur rendement. Afin de séparer les plus gros débris cellulaires, le broyat est filtré à travers huit épaisseurs de gaze. Le filtrat est alors centrifugé pendant 10 mn à 15 000 t/mn. On a pu montrer que dans ces conditions une grande proportion de RNA bicaténaire est associée au culot. Le surnageant est éliminé ou utilisé pour purifier les virions. Le culot est repris avec précaution par un volume minimum de tampon TB 9. Toutes ces opérations sont effectuées dans la glace ou à la chambre froide, afin de maintenir la température au voisinage de 0°C.

La suspension obtenue, que l'on appellera préparation "P₁ 10 000", est déprotéinisée au phénoï : à un volume donné de cette solution, on ajoute un même volume de tampon 2 NaT (tris 0,1 M, pH 7,2, NaCl 0,3M) et deux volumes de phénol saturé de tampon NaT (tris 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,5M). Après 15 mn d'agitation, à température ambiante, l'émulsion est brisée par centrifugation à faible vitesse (5 mn à 2 000 t/mn, dans une centrifugeuse Jouan) et la phase aqueuse est prélevée à la pipette. Pour assurer une déprotéinisation complète, cette opération est répétée une seconde fois. Le phénol restant dans la phase aqueuse est éliminé par plusieurs agitations contre de l'éther éthylique et il est de nouveau nécessaire d'opérer à froid. L'adjonction d'éthanol, jusqu'à une concentration de 66 % permet alors de précipiter les acides nucléiques. Au bout d'une heure ou deux à -20°C, la solution alcoolique est centrifugée pendant 15 mn à 5 000 t/mn, les culots d'acides nucléiques sont séchés sous vide et remis en suspension

dans un volume minimum de tampon NaT . La solution des acides nucléiques obtenue est dialysée pendant 12 heures contre 5 litres de tampon NaT .

IV - 3 - ELIMINATION DES DNA

Les DNA sont éliminés de la solution des acides nucléiques par digestion à la DNase (20 µg/ml d'enzyme en milieu $Mg^{++} 10^{-2}$ M) pendant 30 mn à 37°C . On utilise de la DNase de pancréas de boeuf, exempte de RNase, d'activité égale à environ 2 000 unités KUNITZ/mg, fournie par les laboratoires SIGMA . Après incubation, la DNase est éliminée par déprotéinisation au phénol de la solution en procédant de la même façon que lors de l'extraction des acides nucléiques . Les RNA sont ensuite précipités à l'éthanol à 66 % . Après précipitation complète, la suspension est centrifugée à faible vitesse et les culots sont repris, après séchage sous vide, par un volume minimum de tampon NaT et dialysés 12 heures contre 5 l du même tampon .

Les déoxyribonucléotides libérés par l'hydrolyse enzymatique des DNA sont en partie éliminés lors de la précipitation des RNA dans une solution d'alcool à 66 % .

IV - 4 - FILTRATION SUR SEPHADEX

Les nucléotides encore présents dans la préparation sont séparés des RNA par chromatographie d'exclusion sur colonne . Cette dernière est constituée de perles d'un polysaccharide réticulé, Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala) .

Avant son utilisation, la Sephadex est mise à gonfler durant quelques heures dans un excès de tampon NaT, puis dégazée par agitation sous vide . On remplit alors une colonne de 4 cm de diamètre et environ 40 cm

de hauteur . Après dépôt de 30 à 60 ml d'échantillon, la colonne est éluée par le même tampon NaI, à un débit de 500 ml/h . Les molécules de RNA, dont les dimensions sont supérieures à la limite d'exclusion du gel de Séphadex sont éluées par une quantité de solvant équivalente à un volume mort de la colonne . Par contre, les petites molécules, comme les nucléotides, diffusent dans les pores du gel et sont retardées .

On repère la sortie des acides nucléiques de la colonne en enregistrant la transmission de la lumière par l'éluat, à la longueur d'onde de 255 nm, qui correspond à l'absorption maximale des acides nucléiques . A cette fin, on utilise un appareil Uvicord (L.K.B.) et un enregistreur Graphispot (SEFRAM) .

Après le passage d'une quantité d'éluant correspondant au volume mort de la colonne, on observe un pic très important d'acides nucléiques . Les nucléotides, retardés par la colonne, apparaissent ensuite, en plus petite quantité . On voit sur la Fig. 11, que les temps de passage sont suffisamment distincts pour que l'on puisse séparer les deux espèces .

Les RNA sont à nouveau précipités à l'éthanol à 66 % et centrifugés à faible vitesse . Les culots obtenus sont comme précédemment séchés sous vide, repris par un volume minimum de tampon STE (tris 0,05M, pH 7,2, NaCl 0,1M, EDTA 0,001M) et dialysés, pendant 12 heures, contre un grand volume du même tampon .

La solution ne contient plus alors que des acides ribonucléiques, monocaténaires et bicaténaires, et éventuellement des nucléotides . Ces trois types de composés sont séparés par chromatographie sur cellulose .

IV - 5 - CHROMATOGRAPHIE SUR CELLULOSE

La chromatographie est réalisée sur colonne de cellulose échangeuse d'ions, selon la technique de FRANKLIN (1967) . Les trois espèces moléculaires à séparer sont fixées sur la cellulose, puis détachées successivement par différents éluants .

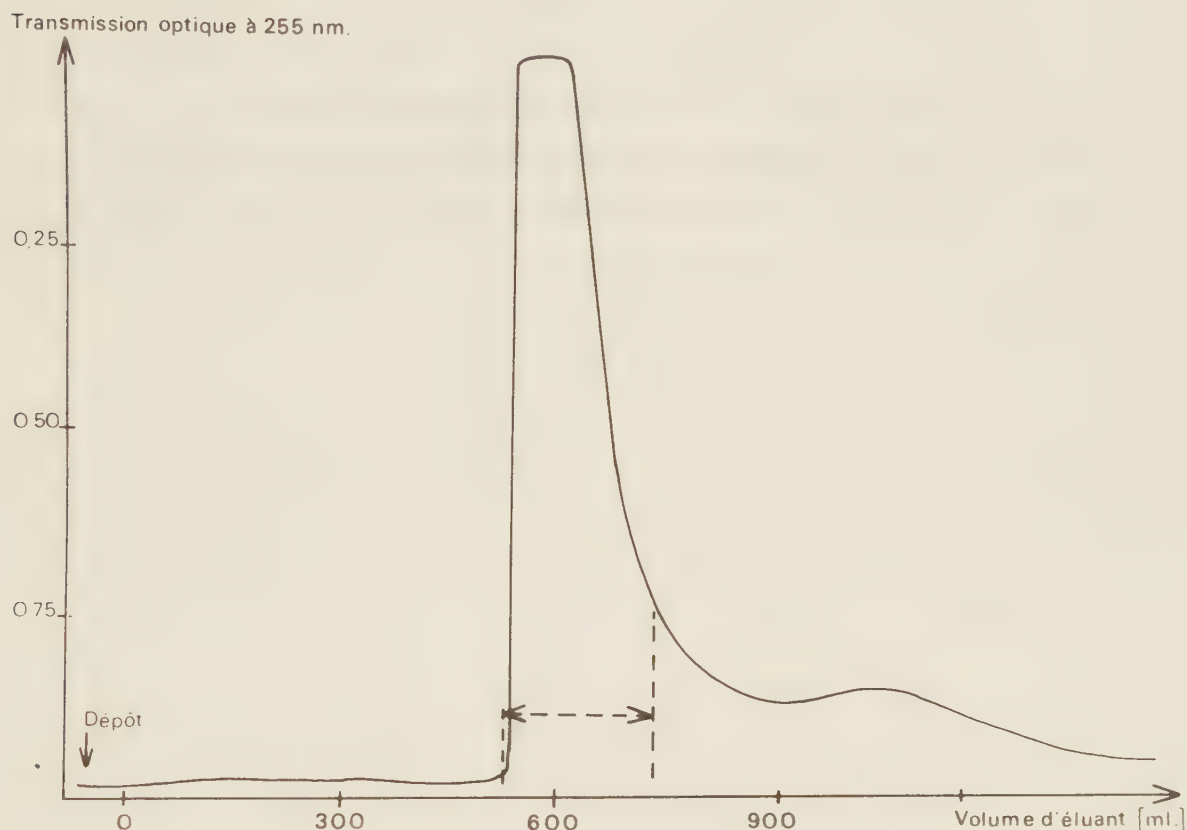


Figure 11 - Filtration sur colonne de Sephadex G 50 des RNA extraits de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN .

Avant d'être utilisée, la poudre de cellulose (WATTMAN CF 11) est rincée plusieurs fois dans du tampon STE et les particules les plus légères sont éliminées . On remplit une colonne de 4 cm de diamètre et 40 cm de hauteur et on fait passer sur la cellulose quelques centaines de ml de tampon STE contenant un agent antibactérien, du β -Mercapto-éthanol, à la concentration de 5 g/l . Enfin, la colonne est équilibrée avec un tampon STE contenant 35 % d'éthanol .

La solution d'acides nucléiques est amenée à une concentration en éthanol de 35 %. Cette opération, ainsi que le dépôt sur la colonne, sont effectués à la température ambiante . Le débit est fixé à 300 ml/h environ .

Comme précédemment, les différents composants sont repérés à leur sortie respective de la colonne par enregistrement de la transmission optique de l'éluat à la longueur d'onde de 255 nm . En éluant d'abord avec un tampon STE à 35 % d'éthanol, on observe en général, un petit pic de nucléotides ; la fraction correspondante est éliminée . Le passage dans la colonne de tampon contenant 15 % d'éthanol permet ensuite de détacher une importante fraction de RNA monocaténares . Enfin, les RNA bicaténares sont élués par du tampon STE pur (Fig. 12) .

Transmission optique à 255 nm.

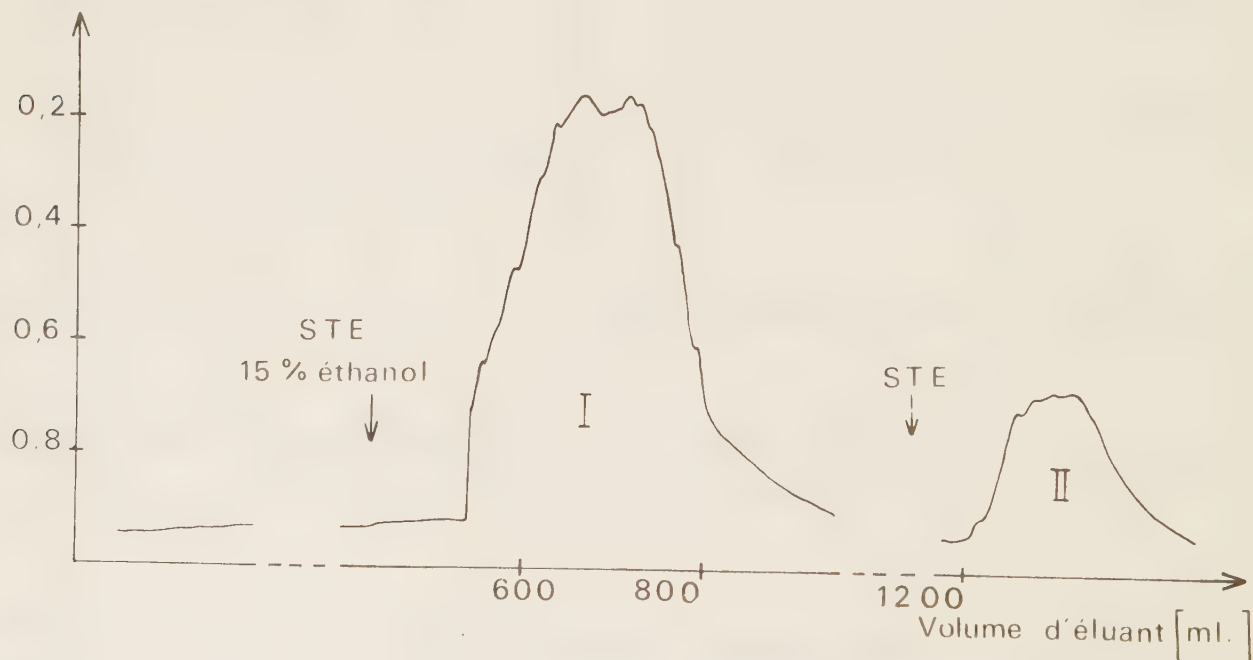


Figure 12 - Separation, par chromatographie sur colonne de cellulose CF-11, des RNA monocaténares et bicaténares extraits de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN .

La fraction I correspond à des RNA monocaténares et la fraction II à des RNA bicaténares .

La concentration en acides nucléiques de cette fraction est faible, en général inférieure à 20 $\mu\text{g/ml}$. Aussi est-il nécessaire de l'augmenter pour que les acides nucléiques précipitent dans l'éthanol à 66 % . Cette opération est réalisée par évaporation sous vide . Les RNA sont ensuite précipités à l'alcool et comme précédemment, remis en suspension dans un petit volume de tampon STE .

Une seconde purification, effectuée sur une colonne de même type, mais de plus petite dimension (diamètre de 2 cm, hauteur de 30 cm) et de la même façon, conduit aux résultats indiqués sur la Fig. 13 .

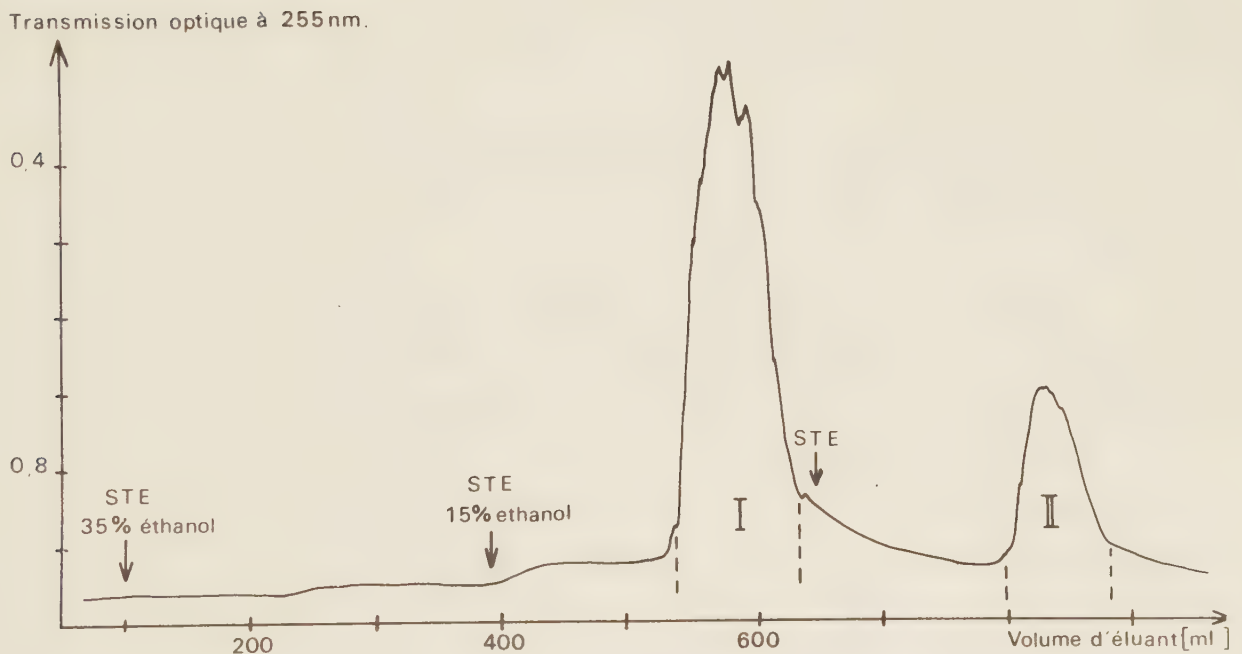


Figure 13 - Deuxième purification du RNA bicaténaires par chromatographie sur colonne de cellulose CF-11 .

Comme pour la figure précédente, les fractions I et II correspondent respectivement aux RNA monocaténares et bicaténares .

On constate qu'il n'y a plus de nucléotides ; par contre une élution par le tampon STE contenant 15 % d'éthanol permet de détacher une fraction non négligeable de RNA monocaténaïres, ce qui justifie cette opération . La suspension de RNA bicaténaire obtenue après élution par du tampon STE (Pic 1) est concentrée par évaporation sous vide et précipitée à l'alcool . Les expériences ultérieures montreront que le produit ainsi purifié ne contient plus de RNA monocaténaïres .

Notons que jusqu'à présent, la purification de la préparation initiale n'est faite qu'en fonction de la nature et de la structure des macromolécules, et non de leur taille, à l'exception de la filtration sur gel de Séphadex ; encore que dans ce dernier cas, on élimine seulement des composés de très faible poids moléculaire . Aussi est-il nécessaire d'effectuer sur la solution obtenue une séparation selon la taille des molécules de RNA .

IV - 6 - CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE

On effectue cette dernière purification par centrifugation de bande en gradient de saccharose, les molécules de l'échantillon étant, dans ce cas, séparées selon leur vitesse de sédimentation, donc selon leur taille .

Le RNA, précipité à l'alcool obtenu à la fin de l'étape précédente, est centrifugé à faible vitesse, repris par deux à trois ml de solution NaCl 0,15M et dialysé quelques heures contre le même solvant . Les gradients de concentration de saccharose, linéaires, de 5 à 20 %, sont préparés à l'aide d'un appareil Buchi, dans des tubes de nitrate de cellulose de 60 ml . Le saccharose utilisé (SCHWARZ-MANN, Qualité pour gradient de densité) est exempt de ribonucléase . Un volume de 0,8 à 1 ml d'échantillon est déposé sur chacun des gradients . Après 15 heures de centrifugation à la vitesse de 23 000 t/mn et à la température de 5°C, dans le rotor SW 25-2 (Beckman), les gradients

sont recueillis et analysés . Comme dans le cas des colonnes de chromatographie, on enregistre la transmission optique de la solution à la longueur d'onde de 260nm . Ainsi que le montre la Fig. 14, l'enregistrement obtenu présente deux pics (fractions A et B) d'importances respectives très inégales . La partie A, qui sédimente le plus rapidement est toujours la plus abondante et nous montrerons par la suite qu'elle est très homogène . L'importance de la partie B, correspondant à des particules plus légères, varie par rapport à celle de A, suivant les préparations et nous verrons ultérieurement qu'elle comporte des macromolécules de différentes tailles .

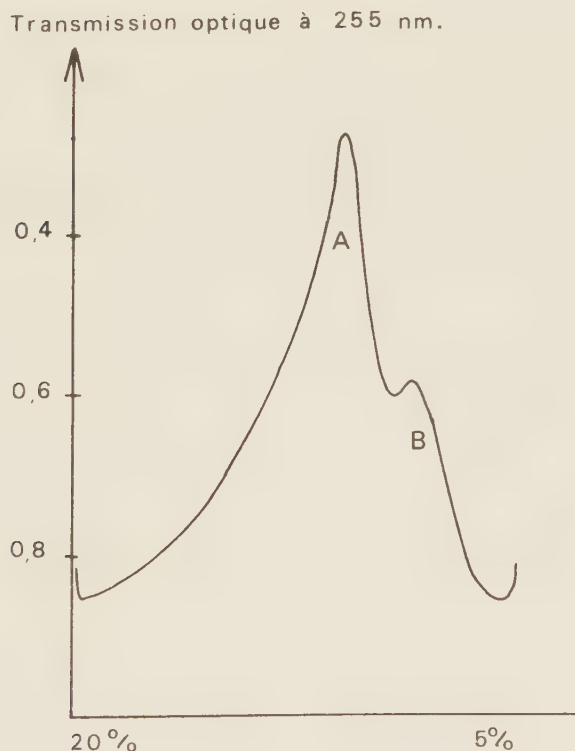


Figure 14 - Purification du RNA bicaténaire par centrifugation de bande en gradient de saccharose 5 - 20 % .

Afin d'éliminer le saccharose, les suspensions de RNA obtenues sont dialysées une nuit contre un grand volume de solution de NaCl 0,15 M . Fina-

lement, après concentration par évaporation sous vide, les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol, centrifugés à faible vitesse et repris par quelques ml de tampon 1 SSC (NaCl 0,15 M, citrate de sodium 0,015 M pH 7,2). Cette opération constitue le stade final de la préparation .

La caractérisation et l'étude des propriétés physico-chimiques du RNA bicaténaire extrait de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN sont effectuées sur ces solutions .

IV - 7 - SYNTHÈSE IN VITRO

Pour effectuer certaines expériences, en particulier des études par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, nous avons préparé du RNA bicaténaire radioactif . En effet, cet acide nucléique peut être marqué au ^{32}P (BOVE et coll., 1965) .

La préparation subcellulaire, 100 P₂ 10000, obtenue à partir de feuilles virosées, est susceptible d'incorporer les quatre nucléosides triphosphates (5' triphosphates d'adénosine, de guanosine, de cytosine et d'uridine) dans le RNA bicaténaire . Si l'un de ces ribonucléotides est marqué au ^{32}P en α , l'atome de phosphore radioactif est incorporé dans le produit de la réaction (BOVE, 1967 ; LAFLECHE et coll., 1972) .

La réaction d'incorporation est effectuée selon la méthode décrite par BOVE (1967) . La préparation subcellulaire 100 P₂ 10000 est incubée en présence d'un mélange réactionnel dont la composition est la suivante :

ATP	0,1M	0,250 ml
CTP	0,1M	"
GTP	0,1M	"
UTP	0,01M	0,050 ml

UTP, $^{32}\text{P}\alpha$		$2.5 \cdot 10^6$ dpm
Phosphoénol pyruvate		1,25 ml
Pyruvate kinase, 2 mg/ml		0,25 ml
Tris pH9	1M	0,10 ml
KCL	1M	0,10 ml
Mg Cl_2	2M	0,050 ml
H_2O	q s p	5 ml

A 10 ml de la préparation 100 P_2^{32} 10000, on ajoute 5 ml de mélange réactionnel, 3 ml de DNase à 1 mg/ml et 2 ml d'eau distillée . L'ensemble est incubé pendant 30 mn à 30°C . Afin de contrôler l'incorporation de phosphate radioactif, on effectue simultanément la réaction sur des fractions aliquotes de 100 μl , avec et sans DNase, avec et sans incubation, comme l'indique le tableau suivant :

	1	2	3	4
100 P_2^{32} 10000	100 μl	100 μl	100 μl	10 ml
DNase (1mg/ml)	0	0	30 μl	3 ml
Mélange réactionnel	50 μl	50 μl	50 μl	5 ml
H_2O	20 μl	20 μl	20 μl	2 ml
Temps d'incubation	0	30 mn	30 mn	30 mn
TCA 15 %	3 ml	3 ml	3 ml	0
cpm du précipité acido insoluble	143	25 090	5 180	

Après réaction, on ajoute dans les tubes 1,2, et 3,3 ml d'acide trichloracétique (contenant du pyrophosphate et de l'orthophosphate 0,02 M) et après 30 mn dans la glace, la solution est filtrée sur fibre de verre . Les filtres sont rincés abondamment par de l'acide trichloracétique à 10 %, séchés et la radioactivité retenue sur les filtres est déterminée à l'aide d'un spectromètre à scintillation (BECKMAN, LS-100). Les résultats obtenus sont indiqués sur le tableau ci-dessus . On peut noter que le tube témoin, correspondant au temps d'incubation 0, ne montre aucune incorporation . Après 30 mn d'incubation et en l'absence de DNase, on observe une incorporation très importante, due aux deux activités RNA polymérases DNA dépendante et DNA indépendante . Enfin, en présence de DNase, l'incorporation relevée est due à l'activité RNA dépendante de la préparation 100 P₂ 10000 (V).

Le tube 4 est centrifugé 15 mn à 10000 g et le culot est remis en suspension dans 30 ml de tampon NaT . La radioactivité incorporée dans une structure ribonucléique bicaténaire est associée à ce culot (BOVE, 1968) . Les acides nucléiques sont alors extraits au phénol et précipités à l'alcool . Le mode opératoire suivi pour isoler le RNA bicaténaire est alors identique à celui qui a été décrit plus haut .

- CHAPITRE V -

PROPRIETES PHYSIQUES DU RNA BICATENAIRE

Après avoir vérifié les propriétés d'absorption dans l'ultraviolet du RNA bicatenaire isolé et l'avoir analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, nous en avons mesuré le coefficient de sédimentation, ce qui nous a permis de contrôler l'homogénéité de la préparation et nous avons déterminé la masse moléculaire .

V - 1 - SPECTRE D'ABSORPTION

L'absorption de la solution de RNA a été mesurée, point par point dans un domaine de longueur d'onde compris entre 220 et 300 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre ZEISS PMQII . Le spectre obtenu Fig. 15 est caracté-

ristique d'un acide nucléique : l'absorption est maximale à 258 nm et minimale à 232 nm . De plus, les rapports des valeurs de la densité optique de la solution de RNA à 258 et 232 nm ainsi qu'à 258 et 280 nm, sont conformes à ceux correspondant à un acide nucléique pur :

$$\frac{\text{D.O. à 258 nm}}{\text{D.O. à 232 nm}} = 2,1$$

D.O. à 232 nm

$$\frac{\text{D.O. à 258 nm}}{\text{D.O. à 280 nm}} = 2,06$$

D.O. à 280 nm

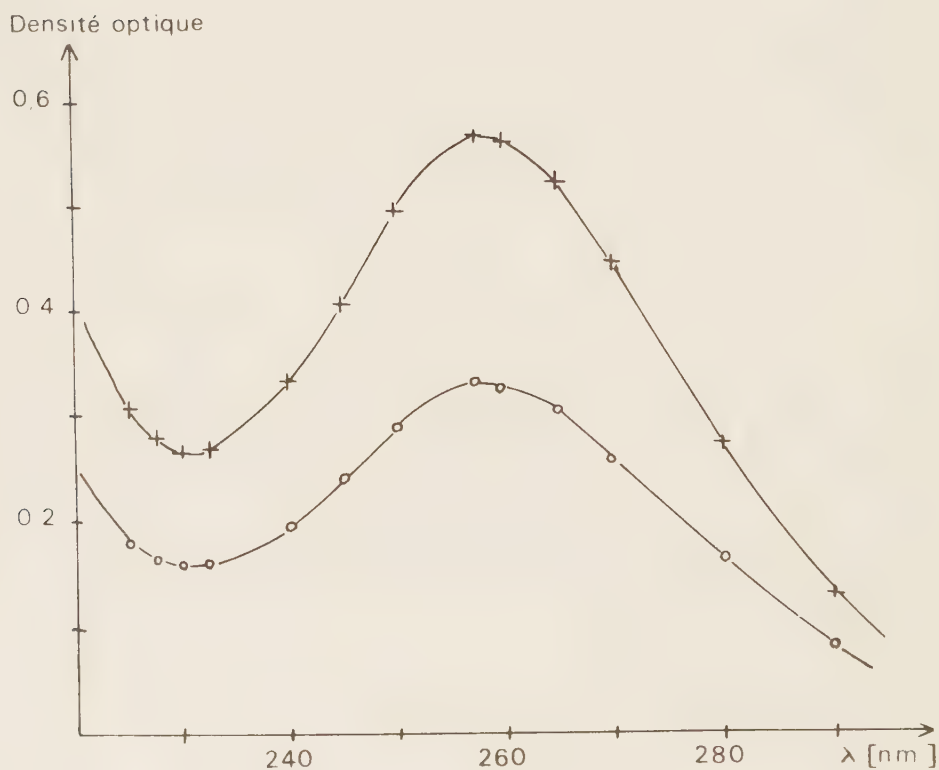


Figure 15 - Spectres d'absorption du RNA bicaténaire, après purification sur gradient de saccharose . Les spectres ont été obtenus point par point à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PMQII . Le trajet optique est de 1 cm

+ - + - + - spectre de la fraction A (voir Fig. 14)

o - o - o - spectre de la fraction B

V - 2 - ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les conditions expérimentales (concentration des gels, composition du tampon d'électrophorèse, champ appliqué) sont les mêmes que celles qui ont été décrites lors de l'étude du RNA viral .

Lorsque le RNA a été marqué au ^{32}P , l'absorption des gels est enregistrée, puis ceux-ci sont congelés à la carboglace . Ils sont alors coupés en tranches de 1 à 2 mm d'épaisseur à l'aide d'un coupeur de gel (Mickle Gel Slicer, Mickle Engineering Co) . La radioactivité des tranches de gel est détectée à l'aide d'un compteur à courant gazeux (Tracerlab) ou d'un compteur à scintillation (LS-100 Beckman) par effet CERENKOV .

Sur la Fig. 16, on a porté simultanément la densité optique et la radioactivité d'un gel, sur lequel ont été déposés environ 2 μg de RNA bicaténaire marqué . On peut constater que les pics de densité optique et de radioactivité, correspondant au RNA bicaténaire, sont bien superposés . D'autre part, le pic d'absorption est très étroit . Ceci rend compte de la grande sensibilité de la méthode, car plus la bande de RNA est étroite, plus la densité optique est élevée au centre de la bande pour une masse de RNA donnée . Dans cas, il suffit de moins de un μg de RNA pour effectuer une expérience . Enfin, la finesse de ce pic d'absorption indique que le RNA correspondant est très monodisperse .

Dans nos conditions expérimentales, le RNA bicaténaire migre beaucoup moins vite que le RNA viral, comme on peut le voir sur le tableau suivant où l'on a porté les mobilités respectives des différents RNA étudiés, en affectant la valeur un au RNA ribosomal 16 S .

RNA	16S	23S	RNA du VMT	RNA bic
mobilité	1	0,776	0,465	0,205

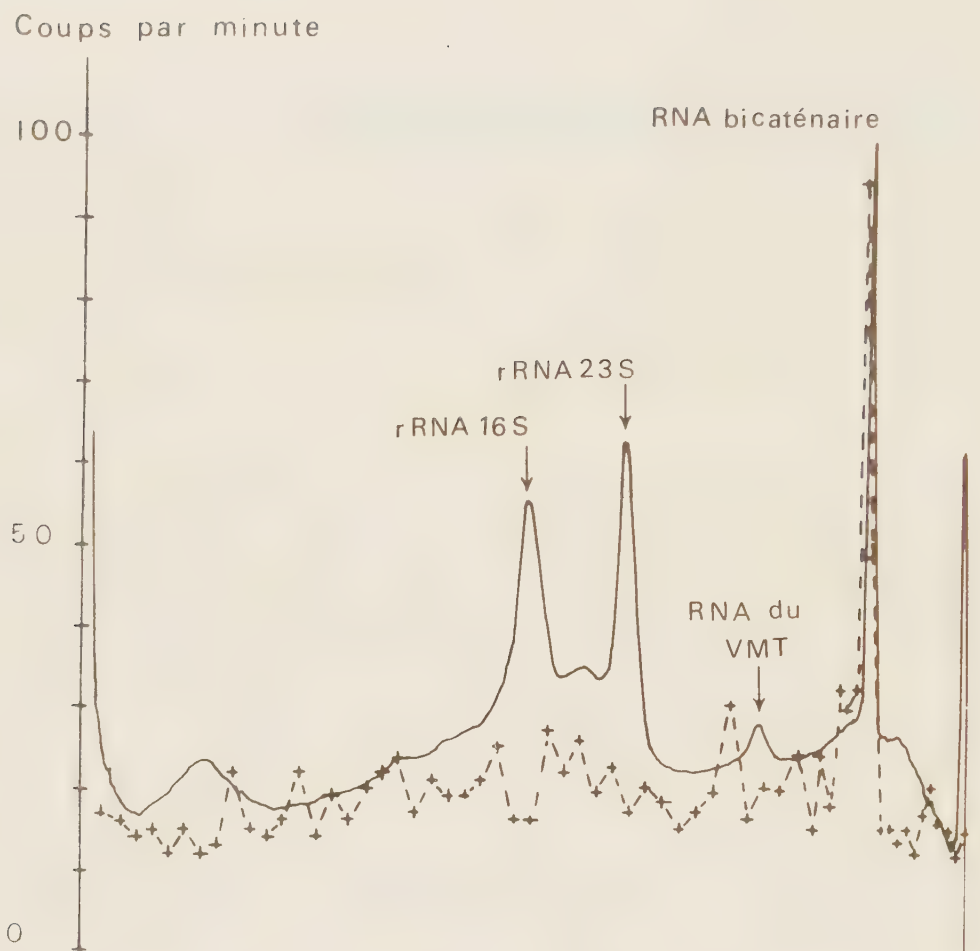


Figure 16 - Coélectrophorèse sur gel de polyacrylamide, à 2 % de RNA bicaténaire marqué au ^{32}P , de RNA du VMT et de RNA ribosomiaux d'*E. coli*. Enregistrement de l'absorption et de la radioactivité du gel .

Cette méthode d'analyse est plus facile à mettre en oeuvre que l'ultracentrifugation analytique et, dans la mesure où le produit étudié est très monodisperse, ne nécessite que peu de matériel . Cependant, si les préparations contiennent une fraction de matériel hétérogène, de faible poids moléculaire, celui-ci passe inaperçu, car il ne provoque qu'une augmentation inappréciable de la densité optique du gel . Ceci est d'autant plus vrai que le composant principal est plus homogène . Enfin, il serait tout à fait illusoire de tenter d'évaluer la masse du RNA bicaténaire à partir de sa mobilité électrophorétique, car sa structure est entièrement différente de celle des RNA témoins .

V - 3 - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION

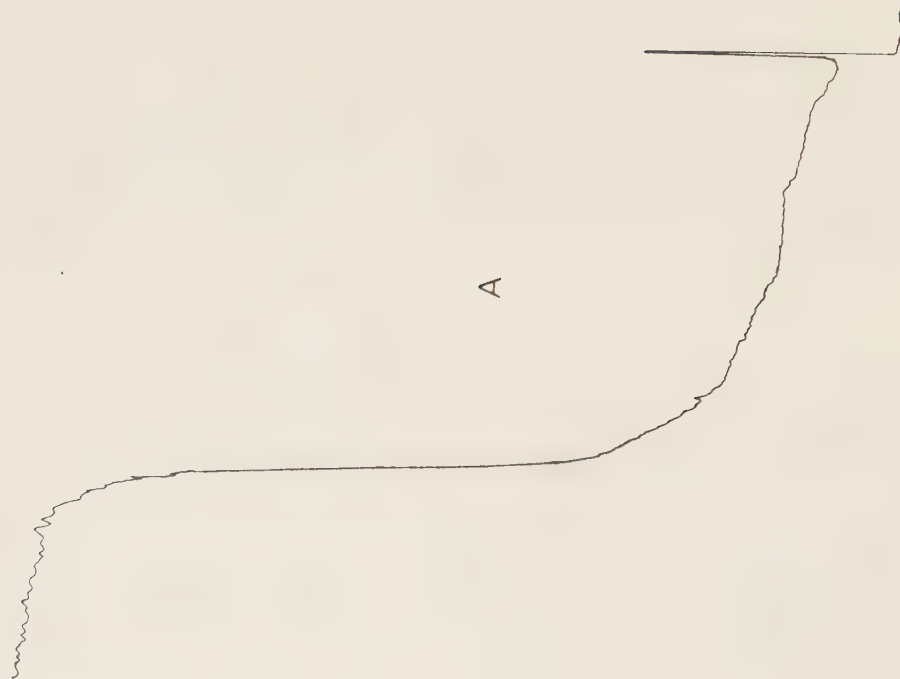
La mesure de la vitesse de sédimentation nous a permis de déterminer à la fois le coefficient de sédimentation moyen et la répartition en poids des coefficients de sédimentation de l'échantillon . A l'aide d'une formule empirique reliant la constante de sédimentation et la masse moléculaire, nous avons pu évaluer celle-ci .

V - 3 - 1 - MODE OPERATOIRE

Pour mesurer le coefficient de sédimentation du RNA bicaténaire, on utilise des cellules de centrifugation à remplissage homogène, en Kel-F de 12 mm d'épaisseur, et dans lesquelles on introduit 0,4 à 0,6 ml de RNA en solution dans un tampon de 1 SSC . La concentration en RNA est de 15 à 30 $\mu\text{g/ml}$, ce qui correspond à une valeur de la densité optique à 260 nm comprise entre 0,4 et 0,8 environ . Lorsque la concentration en RNA est inférieure à 15 $\mu\text{g/ml}$, on utilise des cellules de 30 mm d'épaisseur . Au cours de la centrifugation, effectuée à la vitesse de 50 740 t/mm et à la température de 5°C, on prend, toutes les quatre minutes, une photographie de la cellule . Dans ces conditions, le déplacement de la frontière de sédimentation entre deux clichés successifs est suffisant pour permettre des mesures précises .

V - 3 - 2 - RESULTATS

Un exemple de cliché de sédimentation est représenté sur la Fig. 16 et le densitométrage de l'une de ces photographies de la cellule de centrifugation sur la Fig. 17 . On peut remarquer que la frontière solvant-solution est très nette, ce qui indique que la préparation de RNA bicaténaire est très monodisperse . Il en a été de même pour toutes les préparations étudiées .



Ultracentrifugation analytique du RNA bicaténaire en solution dans un tampon 1 SSC, à la concentration de 30 $\mu\text{g/ml}$.
Vitesse de rotation de 50 740 t/mm, température de 5°C.

Figure 16 - Photographies de la cellule prises toutes les 4 mn, temps de pose de 15 sec.

Figure 17 - Microdensitométrage d'un cliché de sédimentation, (Fig. 16) pris après 30 mn de centrifugation.

Sur la figure 18 nous avons porté $\log r$ en fonction de t , ce qui permet, comme nous l'avons vu plus haut, de déterminer le coefficient de sédimentation dans nos conditions expérimentales. La valeur observée de s est ramenée à celle correspondant aux conditions standard à l'aide de la relation de SVEDBERG et PEDERSEN (1940) que nous rappelons :

$$S_{20,w} = S_{T,Sl} \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{T,Sl}}{\eta_{T,w}} \cdot \frac{1 - \bar{v}_{20,w} \rho_{20,w}}{1 - \bar{v}_{T,Sl} \rho_{T,Sl}}$$

où $\eta_{T,w}$ et $\eta_{20,w}$ sont les viscosités de l'eau à la température T et à 20°C ,

$\eta_{T,Sl}$ et $\eta_{20,Sl}$ les viscosités du solvant à $T^\circ\text{C}$ et 20°C , $\bar{v}_{20,w}$ et $\bar{v}_{T,Sl}$ les volumes spécifiques partiels du soluté dans l'eau à 20°C et dans le solvant à la température T , enfin, $\rho_{20,w}$ et $\rho_{T,Sl}$ les densités de l'eau à 20°C et du solvant à la température de l'expérience.

Le terme $\frac{1 - \bar{v}_{20,w} \rho_{20,w}}{1 - \bar{v}_{T,Sl} \rho_{T,Sl}}$ est très voisin de 1. En effet, en supposant que le volume spécifique partiel du RNA ait la même valeur dans l'eau à 20°C et dans le tampon 1 SSC à 5°C , soit $\bar{v} = 0,55 \text{ cm}^3/\text{g}$, ce facteur vaut 1,012. La correction de viscosité du solvant, $\frac{\eta_{T,Sl}}{\eta_{T,w}}$, est un peu plus importante :

1,04. Mais la variation de la viscosité de l'eau avec la température est le facteur prépondérant. En tenant compte de l'importance relative des différents termes de la relation SVEDBERG-PEDERSEN, on montre que $s_{20,w}$ peut être calculé à l'aide de la relation

$$s_{20,w} = 1,58 s_{5^\circ, 1 \text{ SSC}}$$

Les valeurs déterminées au cours d'un grand nombre d'expériences sont comprises entre 16,7 et 17,3 S, ce qui conduit à la valeur moyenne :

$$s_{20,w} = 17,0 \text{ Svedbergs}$$

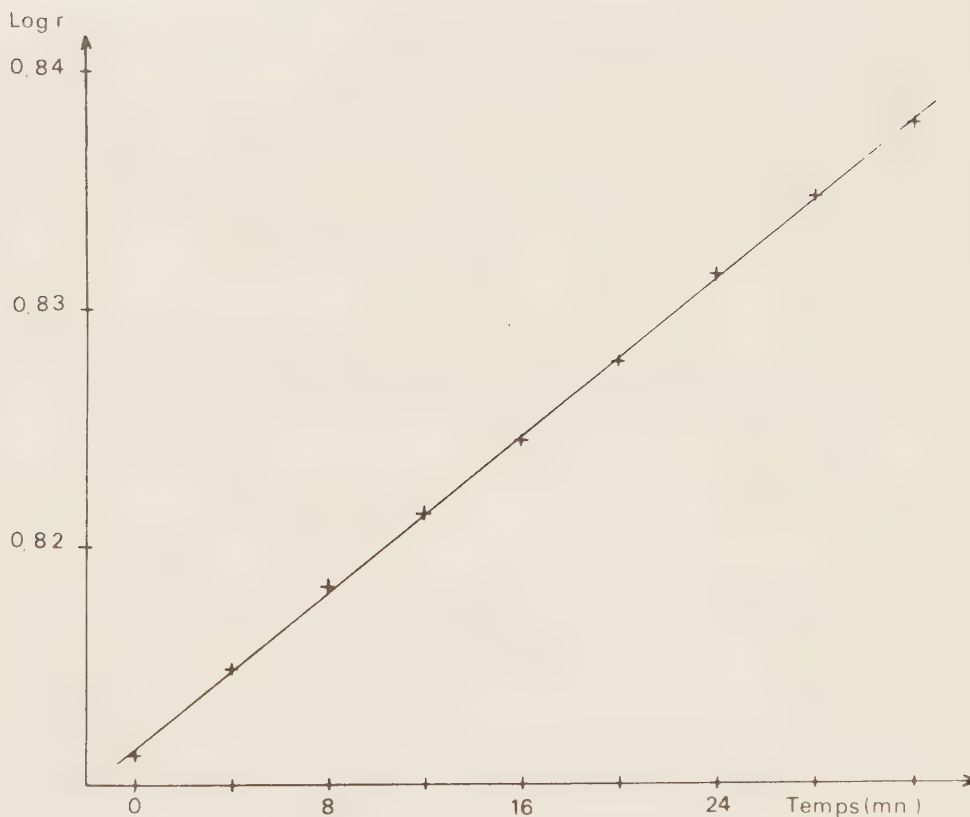


Figure 18 - Détermination du coefficient de sédimentation du RNA bicaténaire . Logarithme de la distance entre la frontière de sédimentation et l'axe de rotation en fonction du temps de centrifugation .

V - 4 - REPARTITION EN POIDS DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION :

Si les conditions expérimentales sont telles que le noircissement de la plaque photographique soit linéaire, le densitométrage des clichés de sédimentation permet de déterminer la densité optique, donc la concentration en RNA, en tout point de la cellule de centrifugation . A partir de cette distribution des concentrations, on peut calculer la répartition en poids des coefficients de sédimentation des molécules de l'échantillon .

$$g(s) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{ds}$$

ou

$$g(s) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{dr} \left(\frac{r}{r_m}\right)^2 r \omega^2 t$$

c_0 est la concentration initiale en macromolécules

c est la concentration au temps t en macromolécules

r est la distance entre l'axe de rotation et le point de la cellule où la concentration en soluté est c .

t est le temps de centrifugation

r_m la distance entre le ménisque et l'axe de rotation.

Le produit $g(s).ds$ représente la concentration des macromolécules dont le coefficient de sédimentation est compris entre s et $(s+ds)$.

Le terme dc/dr a été déterminé graphiquement et nous avons admis que la concentration initiale est égale à celle de la région plateau au temps correspondant au premier cliché.

Il faut remarquer que la répartition des molécules de l'échantillon au temps t est influencée par les phénomènes de diffusion qui se produisent au cours de la centrifugation, et dont il n'a pas été tenu compte dans l'expression de $g(s)$. Nous avons donc calculé cette fonction après différents temps de centrifugation et vérifié que la forme de la courbe obtenue ne dépend pas du temps, ce qui montre que l'élargissement de la frontière de sédimentation, dû à la diffusion des macromolécules, est négligeable dans les conditions expérimentales utilisées (Fig. 19).

Ce résultat était prévisible. En effet, on peut évaluer le coefficient de diffusion D de ce RNA, en utilisant la relation de SVEDBERG :

$$M = \frac{S}{D} \frac{RT}{1-\bar{V}\rho}$$

ou

$$D = \frac{S}{D} \frac{RT}{1-\bar{V}\rho}$$



Figure 19 - Répartition en poids des coefficients de sédimentation d'un échantillon de RNA bicaténaire :

après 27 mm de centrifugation

+ après 35 mm de centrifugation

o après 43 mm de centrifugation

En prenant les valeurs $s = 10$ S, $M = 4,10^6$, $\bar{V} = 0,55$ cm³/g et $T = 278$ K, on obtient $D = 0,13 \cdot 10^{-7}$ cm²/s . A titre de comparaison, le

coefficient de diffusion d'un virus sphérique, du type VMJN, est de 1 à $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, c'est-à-dire 10 fois plus grand . Le coefficient de diffusion du RNA bicaténaire est donc très faible et l'on peut négliger les effets des phénomènes de diffusion sur l'élargissement de la frontière de sédimentation .

La courbe $g(s)$ a donc été calculée à partir d'un cliché obtenu après environ 30 mn de centrifugation . A ce moment, dans les conditions expérimentales utilisées, la frontière solvant-solution se trouve approximativement au milieu de la cellule de centrifugation .

La figure 20 représente une répartition typique des coefficients de sédimentation d'une préparation de RNA bicaténaire . Comme l'indiquent les courbes de densitométrie des clichés de sédimentation, cette répartition présente un maximum aigu . En effet, 80 % des molécules ont un coefficient de sédimentation compris entre 16,5 et 17,5 S .

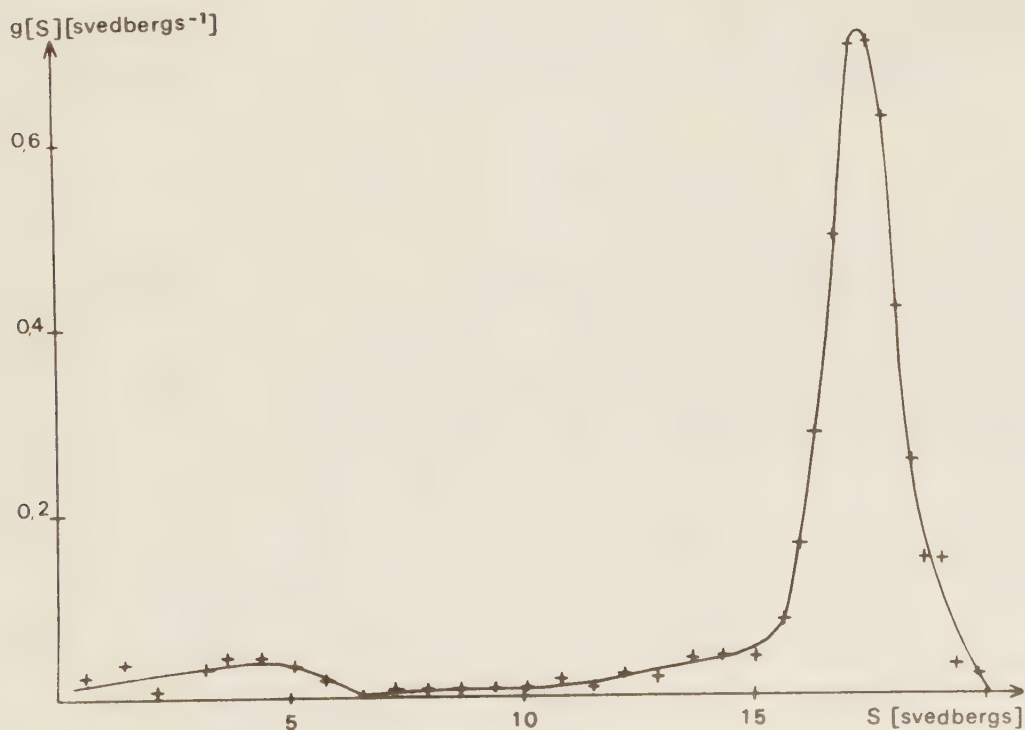


Figure 20 - Répartition en poids des coefficients de sédimentation d'un échantillon de RNA bicaténaire .

V - 5 - REPARTITION EN POIDS DES MASSES MOLÉCULAIRES

Afin de caractériser de façon plus précise les macromolécules de RNA bicaténaire, nous avons évalué, à partir des coefficients de sédimentation que nous venons de déterminer, leur masse moléculaire . En effet, STUDIER (1965) a établi expérimentalement une relation entre le coefficient de sédimentation et la masse moléculaire d'un DNA . Dans le cas d'un DNA bicaténaire :

$$s = 0,0882.M^{0,346}$$

soit $M = 1,13.10^3 s^{2,89}$

s étant exprimé en Svedbergs .

Si, en raison de l'analogie de structure entre le DNA et le RNA bicaténaires, on admet que cette formule est valable dans le cas de ce dernier, on obtient, pour un coefficient de sédimentation de 17 S, une masse moléculaire de $4,0.10^6$.

D'autre part, étant donné que l'on dispose d'une relation entre s et M , et que l'on connaît la répartition des coefficients de sédimentation d'un échantillon, on peut calculer la répartition en poids des masses moléculaires . On définit cette dernière par l'expression :

$$h(M) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{dM}$$

c_0 étant la concentration totale, ou en explicitant par rapport au coefficient de sédimentation :

$$h(M) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{ds} \frac{ds}{dM}$$

soit $h(M) = g(s) \frac{ds}{dM}$

Le terme $\frac{dc}{ds}$ peut être calculé à partir de la relation de STUDIER :

$$dM = 11,3 \cdot 10^3 \cdot 2,89 s^{1,89} ds$$

$$\frac{ds}{dM} = 3,06 \cdot 10^{-4} s^{-1,89}$$

d'où

$$h(M) = 3,06 \cdot 10^{-4} \cdot s^{-1,89} g(s)$$

La répartition en poids des masses moléculaires d'un échantillon de RNA bicaténaire est représentée sur la Fig. 21. On observe que la courbe obtenue présente un maximum très net, correspondant à la valeur de la masse moléculaire de $4,1 \cdot 10^6$.

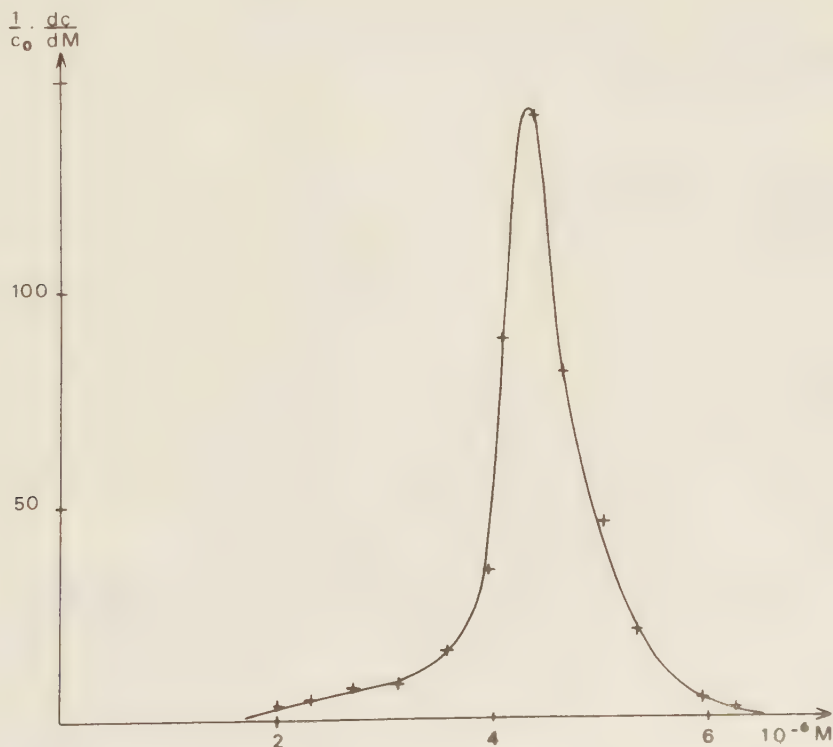


Figure 21 - Répartition en poids des masses moléculaires d'un échantillon de RNA bicaténaire.

Par ailleurs, des échantillons de RNA bicaténaire ont été examinés au microscope électronique par GRANDBOULAN suivant la technique de KLEINSCHMIDT basée sur l'étalement sur monocouche de protéine . Les longueurs d'un grand nombre de molécules de RNA ont été mesurées et l'histogramme correspondant est représenté sur la Fig. 22 . On constate que 24 % des molécules ont une longueur comprise entre 1,90 et 2,00 μ et 50 % entre 1,70 et 2,20 μ . La masse des molécules étant proportionnelle à leur longueur, le produit $N \times L$ (N étant le nombre de molécules de longueur L) est proportionnel à la fraction pondérale de ces molécules de longueur L . On peut déduire

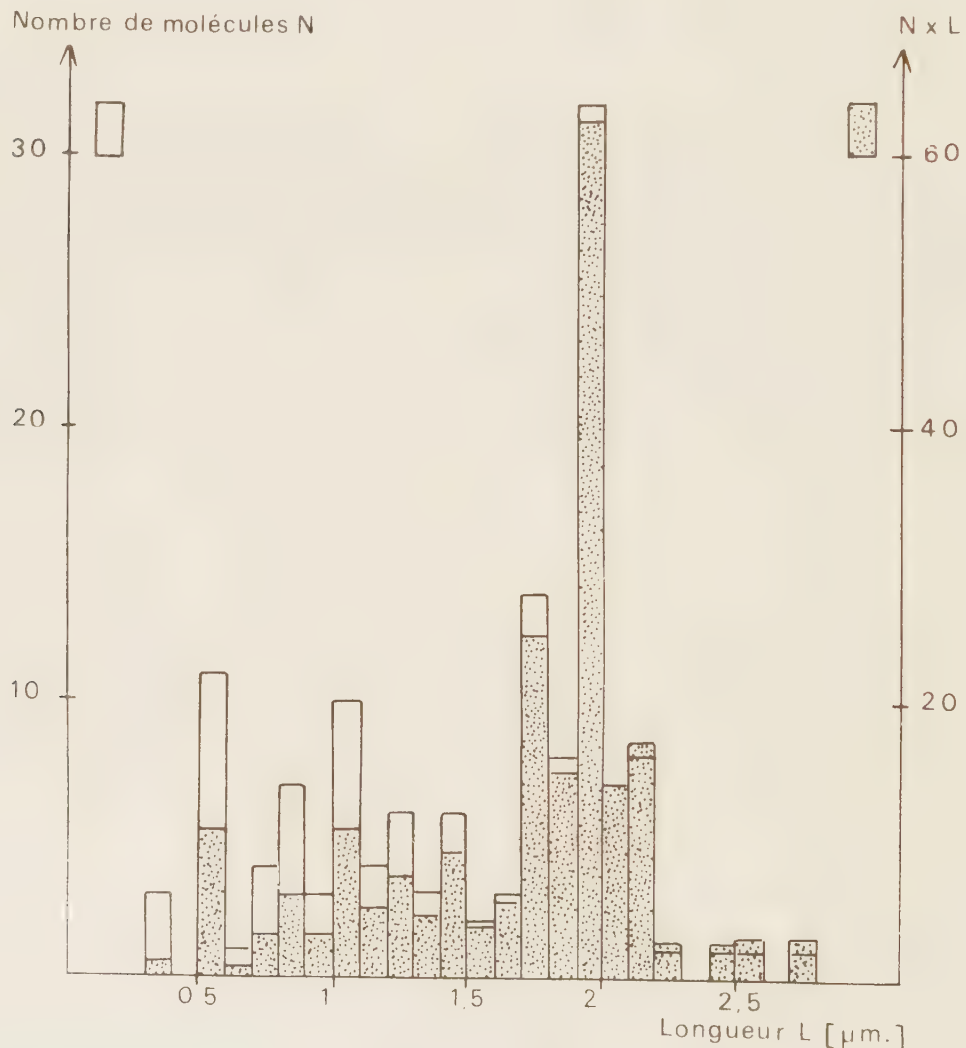


Figure 22 - Etude au microscope électronique. Répartition en nombre et répartition en poids des longueurs des molécules de RNA bicaténaire .

de cette répartition en nombre la répartition en poids, en portant le produit ($N \times L$) en fonction de L .

Les résultats obtenus par deux méthodes différentes sont en bon accord et les répartitions en poids des masses moléculaires d'un échantillon de RNA bicaténaire sont tout à fait comparables . Elles présentent toutes les deux un maximum accusé pour une masse de $4,1.10^6$ daltons .

V - 6 - DIFFRACTION DES RAYONS X

Des fibres de RNA bicaténaire ont pu être étirées à partir de gel . Ces fibres ont un diamètre très faible, de l'ordre de 7 à 8 μ , si bien que l'obtention des clichés de rayon X satisfaisants s'est révélée extrêmement délicate . Néanmoins, nous avons obtenu des clichés où les taches de diffraction, sur les strates d'ordre 7, 8, et 9 sont très visibles et où l'on peut également distinguer les taches sur les strates d'ordre 2 et 5 . Par contre, la partie centrale des clichés est voilée par le fond continu, car il est nécessaire d'opérer avec des temps de pose de l'ordre de 8 jours (ALBISER et coll., résultats non publiés) . Cependant, ces clichés sont tout à fait semblables à ceux obtenus par différents auteurs à partir de RNA bicaténaires (ARNOTT et coll., 1967 a et b, ARNOTT, 1970) .

Ces clichés ont été obtenus selon la méthode classique, avec des chambres à humidité contrôlée, traversées par un courant d'hydrogène et en utilisant un générateur HILGER à microfoyer .

A partir de ces clichés, il était possible de déterminer, d'une part le pas de la double hélice, d'autre part, l'espacement entre paires de bases . On a obtenu respectivement $29,5 \pm 0,1$ Å et 2,85 Å .

Ces données sont tout à fait compatibles avec celles que nous avons obtenues par ailleurs puisqu'en supposant une masse moléculaire de $4,2.10^6$

et une masse moléculaire moyenne des résidus nucléotidiques de 320 le nombre de paires de bases serait de 6 550 et la longueur de la molécule de 1,87 μ . Ce résultat est en accord avec les données de la microscopie électronique (voir Fig. 22) .

V - 7 - EQUILIBRE DE SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE

Les expériences par équilibre de sédimentation en gradient de densité, dont le principe est indiqué au chapitre I, ont permis, d'une part de confirmer la valeur de la masse moléculaire du RNA bicaténaire, d'autre part de déterminer sa densité .

V - 7 - 1 - MODE OPERATOIRE

On prépare une solution de sulfate de césium (MERCK, Suprapur) dont la fraction en poids de sel (poids de $\text{Cs}_2 \text{SO}_4$ par gramme de solution) est de 0,460, ce qui correspond à une densité de 1,61 g/cm^3 . Cette solution contient en outre quelques microgrammes du RNA étudié par millilitre . La concentration en sulfate de césium est déterminée avec précision en pesant les composants de la solution et on déduit la masse spécifique ρ de celle-ci à partir des données de WAKE et BALDWIN (1962) . Cette valeur est vérifiée, avant centrifugation, en mesurant l'indice de réfraction de la solution à la température de 25°C, n^{25} , à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE . La relation :

$$d^{25} = a n^{25} - b$$

où $a = 13,6986$ et $b = 17,3233$ (valeurs citées par VINOGRAD et HEARST) permet de calculer la densité à 25°C de la solution .

Un volume d'environ 0,5 ml de cette solution est placé dans une cellule de centrifugation à remplissage homogène . On y ajoute quelques gouttes d'un hydrocarbure fluoré, liquide dense et inerte, (FC-43) de façon à former, au cours de la centrifugation, un fond artificiel cylindrique . La centrifugation est effectuée généralement à la vitesse de 37 000 t/mn, la température du rotor étant maintenue à 5°C . Dès que la vitesse de régime choisie est atteinte, on prend quelques clichés schlieren, à différents angles de la plaque de phase . Après 7 à 8 heures de centrifugation, l'équilibre de sédimentation-diffusion du sulfate de césium est atteint . Lorsque l'on veut étudier la transition vers l'état d'équilibre du RNA bicaténaire, on prend des photographies de la cellule, à l'aide du système optique à absorption dans l'U.V., à intervalles réguliers .

Au bout de 48 heures, on peut estimer que la bande de macromolécules est à l'équilibre, et on prend de nouveau une série de clichés schlieren, aux mêmes angles de la plaque de phase qu'au début de la centrifugation, et des photographies U.V., à différents temps de pose . L'expérience peut alors être arrêtée .

V - 7 - 2 - DENSITE DE SOLUTIONS DE SULFATE DE CESIUM EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Les valeurs de la densité d'une solution de sulfate de césium, en fonction de la concentration en sel ou de l'indice de réfraction de la solution, sont données pour une température de 25°C . Comme les centrifugations ont été effectuées à la température de 5°C, nous avons étudié la variation de la densité de solutions de sulfate de césium avec la température .

La densité des solutions est mesurée à l'aide d'une balance hydrostatique, par rapport à l'eau à 4°C . Le liquide est thermostaté et sa température est déterminée au moyen d'un thermocouple .

La Fig. 23 représente la variation, en fonction de la température,

de la densité d'une solution de sulfate de césium de concentration 0,484 (exprimée en g. de sel par g. de solution). La différence entre les valeurs de la densité de la solution à 5 et 25°C est de 0,012 g/ml .

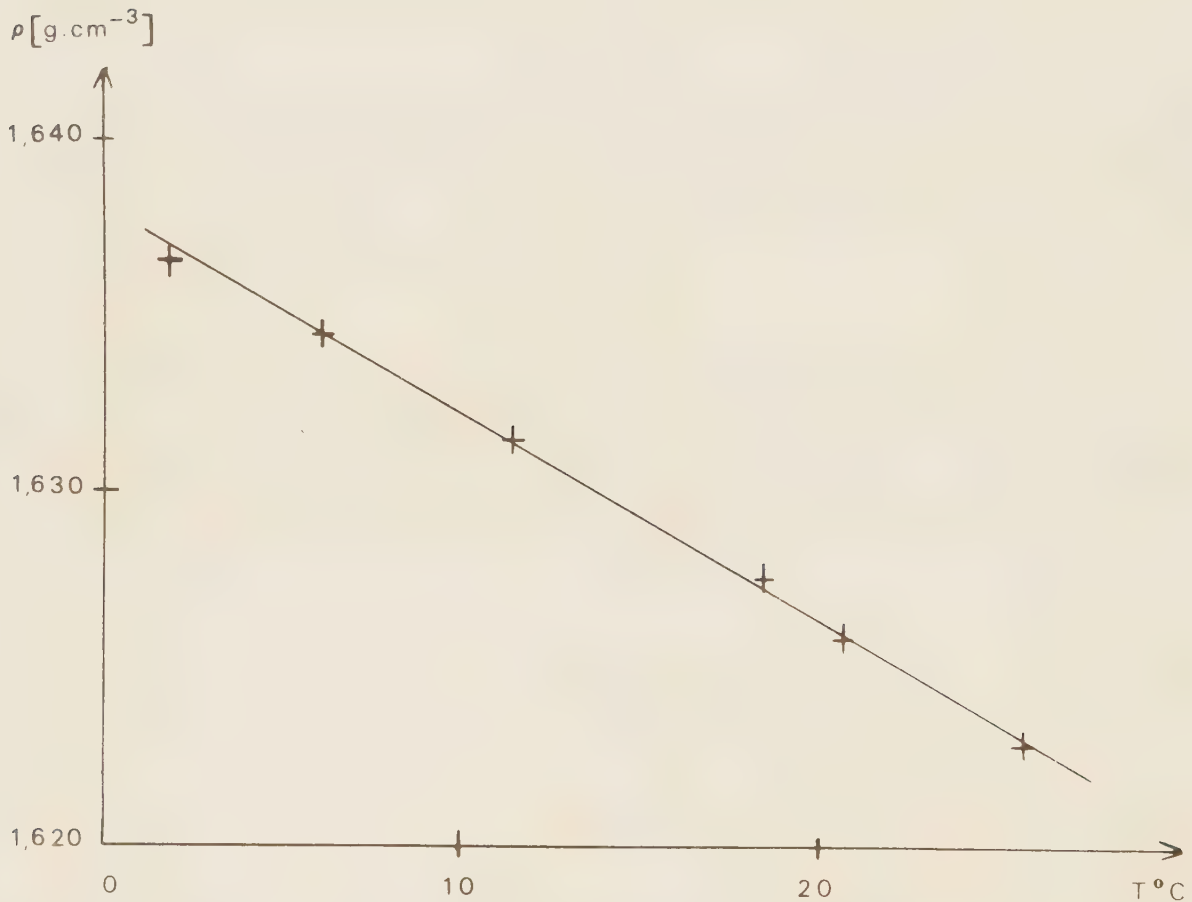


Figure 23 - Variation de la densité d'une solution de sulfate de césium en fonction de la température .

V - 7 - 3 - DETERMINATION DU GRADIENT DE DENSITÉ

La figure 24a représente les clichés schlieren pris au début et à la fin de la centrifugation . On constate que le gradient de densité de sulfate

de césium est constant sur toute la hauteur de la colonne de liquide, dans les conditions où nous avons opéré : vitesse de 37 000 t/mm . Mais si les modalités expérimentales sont différentes, il n'en est plus de même . Ainsi, lorsque la vitesse de rotation du rotor est plus élevée, par exemple 44 800 t/mm, le gradient de densité n'est plus constant, mais varie linéairement avec la distance à l'axe de rotation et sa valeur est plus élevée au ménisque qu'au fond de la cellule . (Fig. 24b) . Par contre, à vitesse plus faible, 27 000 t/mm, le gradient de densité augmente avec la distance (Fig. 24c) .

Le fait que, à certaine vitesse, le gradient de densité soit constant, ou même qu'il diminue lorsque la distance à l'axe de rotation augmente, ne peut s'expliquer par l'effet de la pression hydrostatique dans la cellule de centrifugation . En effet, quelle que soit la hauteur totale de la colonne de liquide, donc la pression régnant dans la cellule, à une vitesse de rotation donnée, la forme du gradient reste la même . On doit donc admettre, que le coefficient de proportionnalité β , intervenant dans le calcul $d\rho/dr$ (relation 4, chap. I) varie fortement avec la densité de sulfate de césium . Dans le domaine de concentration observé, c'est-à-dire pour ρ compris entre 1,57 et 1,68 g/cm³, β décroît linéairement quand ρ augmente et, pour une certaine valeur de la vitesse de rotation, à l'équilibre, l'augmentation de l'accélération, $\omega^2 r$, selon l'axe de la cellule, est compensée par celle de la densité de la solution, si bien que le gradient de sulfate de césium est constant .

La relation (8) permettant de calculer la densité de la solution au centre de la bande de macromolécules, devient, quand le gradient $d\rho/dr$ est constant :

$$\rho_0 - \rho_i = d\rho/dr (r_0 - r_i) \quad (13)$$

r_i étant l'abscisse du point isopycnique, c'est-à-dire du point où, à l'équilibre, la densité de la solution est égale à la densité initiale ρ_i ,



Figure 24 - Détermination du gradient de densité de sulfate de césium.

a_1 , b_1 et c_1 : clichés schlieren pris dès que la vitesse de régime est atteinte

a_2 : cliché schlieren, à l'équilibre, vitesse de rotation de 27 000 t/mn

b_2 : cliché schlieren, à l'équilibre, vitesse de rotation de 37 000 t/mn

c_2 : cliché schlieren, à l'équilibre, vitesse de rotation de 44 800 t/mn

et r_0 l'abscisse du centre de la bande de macromolécules, où la densité de la solution saline est ρ_0 .

Lorsque le gradient de densité est proportionnel à la distance à l'axe de rotation, c'est-à-dire que β est indépendant de la concentration en sel, r_i est calculé à l'aide de la relation :

$$r_i^2 = \frac{1}{2} (r_m^2 + r_f^2) \quad (14)$$

où r_m et r_f sont les abscisses respectives du ménisque et du fond de la cellule.

Par contre, dans nos conditions expérimentales, $d\rho/dr$ est constant et la relation (14) n'est plus valable. On peut alors calculer r_i en tenant compte du fait que la masse de la solution se conserve au cours de la centrifugation, soit :

$$\int_{r_m}^{r_f} \rho_i \phi e r dr = \int_{r_m}^{r_f} \rho(r) \phi e r dr$$

Dans cette relation, ϕ est l'angle formé par le secteur de la cellule, e l'épaisseur de la cellule et par conséquent, $(\phi e r dr)$ l'élément de volume compris entre r et $(r + dr)$

$$\text{or : } \rho(r) = \rho_i + \int_{r_i}^r \frac{d\rho}{dx} dx$$

et comme la valeur du gradient est constante, soit $\frac{d\rho}{dr} = k$,

$$\rho(r) = \rho_i + k(r - r_i)$$

En remplaçant $\rho(r)$ par cette valeur dans l'expression (14)

$$\phi e \int_{r_m}^{r_f} \rho_i r dr = \phi e \int_{r_m}^{r_f} [\rho_i + k(r - r_i)] r dr$$

$$\text{soit : } k \phi e \int_{r_m}^{r_f} (r - r_i) r dr = 0$$

En intégrant et en regroupant les termes, on obtient :

$$r_i = \frac{2}{3} \frac{r_f^3 - r_m^3}{r_f^2 - r_m^2}$$

soit en simplifiant par $(r_f - r_m)$

$$r_i = \frac{2}{3} \frac{r_f^2 + r_m^2 + r_f r_m}{r_f + r_m}$$

La valeur r_i obtenue par cette méthode est inférieure à celle qui serait calculée en supposant que le gradient de densité est proportionnel à r , la différence entre les deux valeurs étant de l'ordre de 10^{-2} cm. Le terme $d\rho/dr$ a été déterminé en utilisant la relation (10, chap. I) et enfin la densité de la solution au centre de la bande de RNA, à l'aide de la relation (13) .

V - 7 - 4 - APPLICATION AU CAS DU RNA VIRAL

Cette technique a d'abord été appliquée au cas du RNA extrait du VMJN selon la méthode que nous avons décrite . Comme de nombreux acides ribonucléiques monocaténares, (RNA du TMV, du BMV, RNA ribosomaux) le RNA du VMJN précipite en présence d'une forte concentration de sulfate de césium . Ce phénomène est attribué à la formation d'agrégats par établissement de liaisons hydrogène entre différentes chaînes de RNA à haute concentration saline (GRUNBERG-MANAGO et GROS, 1964) . Aussi, lorsqu'on centrifuge un tel RNA en gradient de densité de sulfate de césium, il précipite et se rassemble en une bande très fine qui n'est pas toujours visible sur les clichés . Il est possible de pallier à cet inconvénient en ajoutant au milieu, un composé, comme la formaldéhyde, qui empêche la formation de liaisons entre les séquences complémentaires de chaînes ribonucléiques différentes (LOZERON et SZYBALSKI, 1966) . Si la solution de sulfate de césium contient 1 % de formaldéhyde, le RNA du VMJN reste bien en suspension .

Dans le cas du RNA viral, la solution de sulfate de césium a une densité initiale de $1,64 \text{ g/cm}^3$, et contient 1 % de formaldéhyde et quelques μg de RNA . Après 48 h de centrifugation à la vitesse de 37 000 t/mm, l'équilibre est atteint et l'on observe une bande de RNA au voisinage du centre de la cellule . Le densitométrie de la photographie de la cellule permet de constater que la répartition des molécules de RNA est symétrique .

Plusieurs déterminations de la densité de flottation du RNA du VMJN dans le sulfate de césium, selon la méthode indiquée plus haut, conduisent à une valeur moyenne de ce paramètre de $1,648 \text{ g/cm}^3$.

La largeur de la bande d'acide nucléique, σ , est déterminée en portant $\text{Log} \left(\frac{c}{c_0} \right)$ en fonction de $(r - r_0)^2$, c étant la concentration au point d'abscisse r , c_0 et r_0 correspondant au centre de la bande (Fig. 26) . La courbe obtenue est une droite dont la pente est égale à $-\frac{1}{2\sigma^2}$

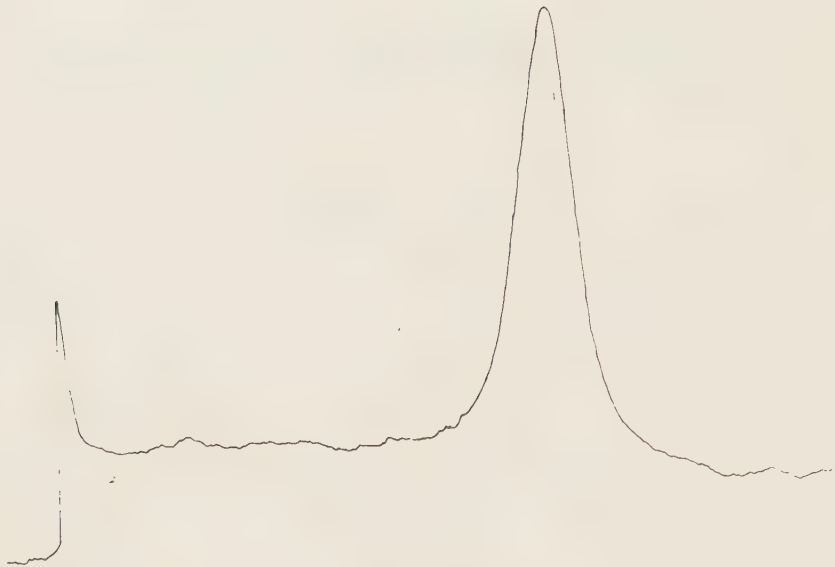


Figure 25 - Equilibre de sédimentation, en gradient de densité de sulfate de césium, du RNA du VMJN, vitesse de rotation de 37 000 t/mn et température de 5 °C . Densitomètrage du cliché à l'équilibre .

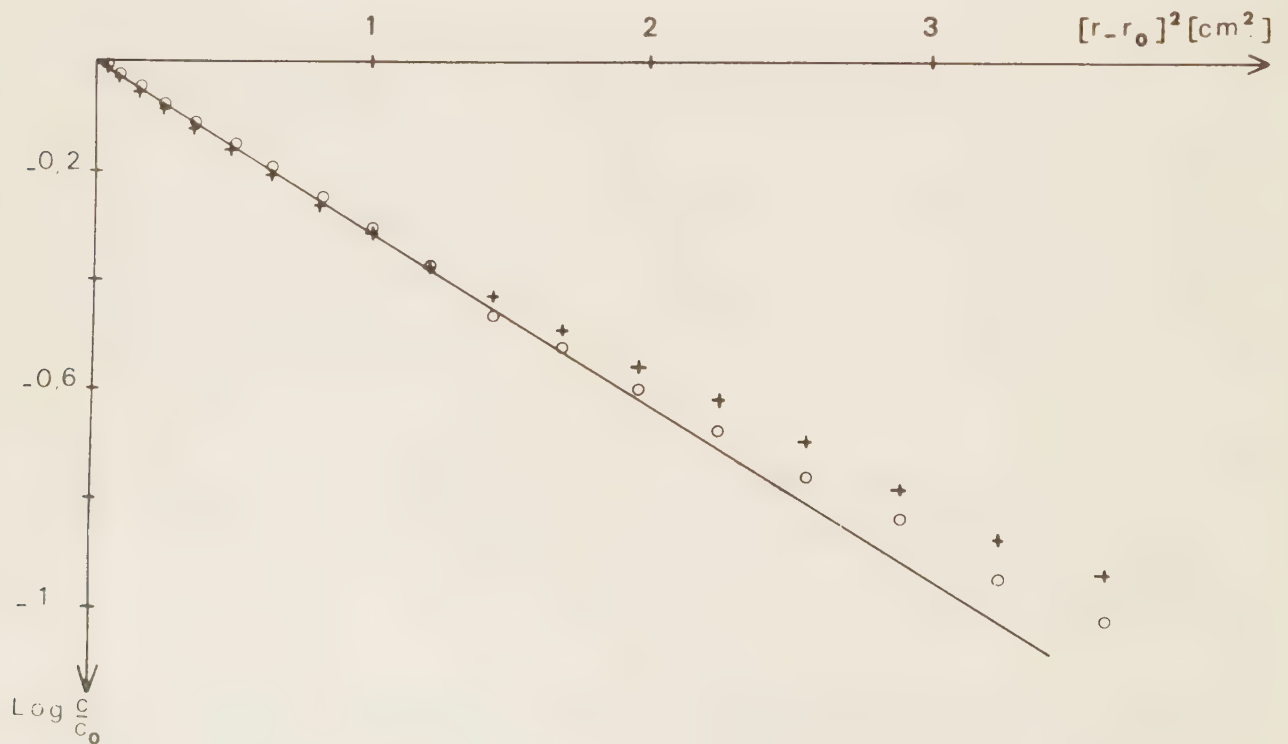


Figure 26 - Equilibre de sédimentation en gradient de densité du RNA viral . Détermination de σ

En effet, on peut également écrire la relation (5 chap. I) sous la forme suivante :

$$\text{Log } \frac{c}{c_0} = - \frac{1}{2,303} \frac{(r - r_0)^2}{2 \sigma^2}$$

Il faut cependant remarquer que la distribution des macromolécules n'est plus gaussienne pour les grandes valeurs de $(r - r_0)^2$, c'est-à-dire pour $\underline{c}$ inférieur à 0,1 ou 0,2 . Ce fait n'est pas surprenant car les préparations de RNA du VMJN contiennent toujours, comme on a pu le vérifier par des expériences de vitesse de sédimentation, 5 à 15 % de matériel de faible poids moléculaire .

Connaissant σ^2 , ρ_0 et dp/dr , on peut évaluer la masse moléculaire du RNA en solution . On obtient une valeur de $2,1 \cdot 10^6$, très proche de celle déterminée par STRAZIELLE et coll. (1965) par diffusion de la lumière : $2 \cdot 10^6$.

V - 7 - 5 - APPLICATION AU CAS DU RNA BICATENAIRE

Dans le cas du RNA bicaténaire, on opère sensiblement comme dans celui du RNA viral pour réaliser les expériences de sédimentation en gradient de densité . Cependant, les solutions de sulfate de césium ont une densité initiale plus faible, généralement de $1,610 \text{ g/cm}^3$. Ainsi, la bande de RNA bicaténaire, dont la densité de flottation est plus faible que celle du RNA du VMJN se trouve, à l'équilibre, au voisinage du point isopycnique . Par ailleurs, en milieu de forte concentration saline, le RNA bicaténaire ne forme pas d'agrégats, comme le RNA viral, et il n'est pas nécessaire d'ajouter de la formaldéhyde à la solution .

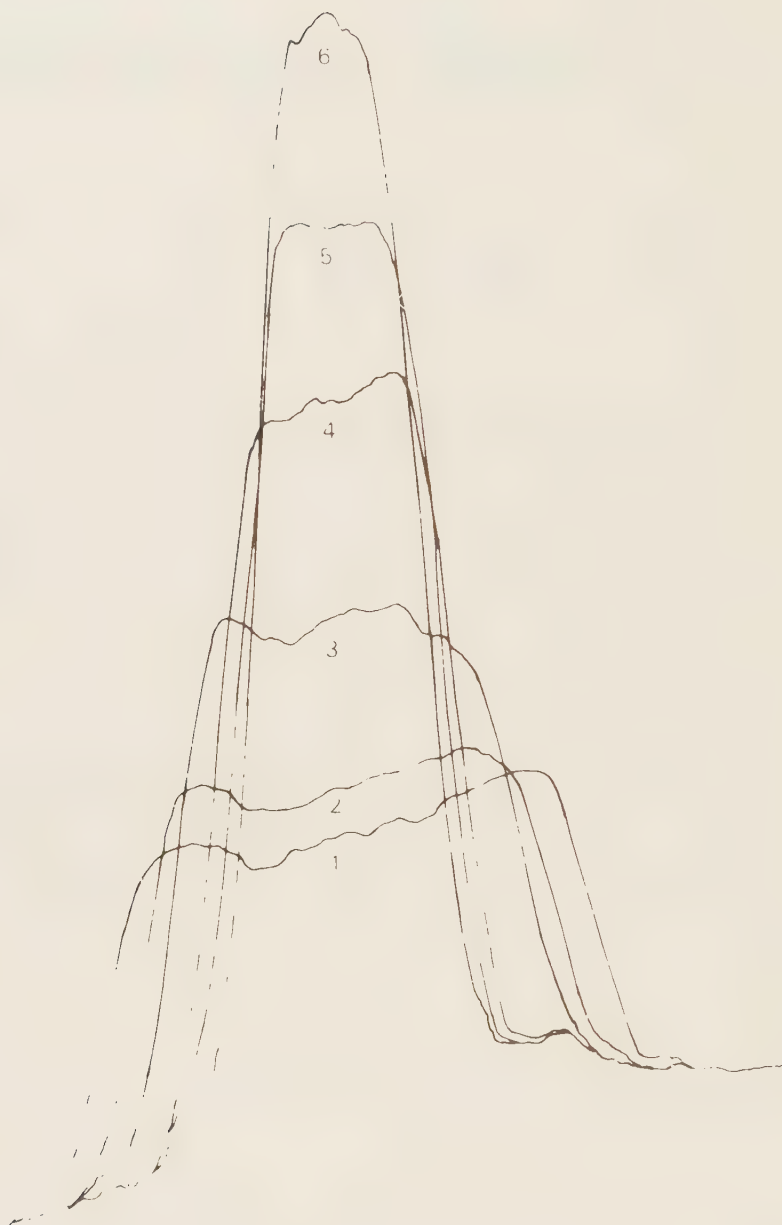


Figure 27 - Centrifugation à l'équilibre, en gradient de densité de sulfate de césium, du RNA bicaténaire . Densitomètrages des clichés obtenus après différents temps de centrifugation à la vitesse de rotation de 37 000 t/mn : 1 : 12 h 30 mn, 2 : 14 h 40 mn, 3 : 16 h 30 mn, 4 : 21 h, 5 : 22 h 10 mn, et 6 : 25 h 20 mn .

Nous avons vérifié que, à vitesse choisie, 40 heures de centrifugation suffisent pour atteindre l'équilibre. En effet, la largeur de la bande de RNA n'est plus modifiée si l'on prolonge l'expérience. Les densitométrages des clichés pris au cours de l'expérience et après 48 heures de centrifugation (Fig. 27 et 28) montrent que la répartition des molécules de RNA est symétrique. Ce fait est particulièrement bien mis en évidence lorsqu'on porte sur graphique $\log \left(\frac{c}{c_0} \right)$ en fonction de $(r - r_0)^2$: les deux points correspondant à la même valeur absolue de $(r - r_0)$ sont pratiquement superposés (Fig. 29). La courbe obtenue est bien une droite et ce n'est que pour les faibles valeurs du rapport $\frac{c}{c_0}$ ($\frac{c}{c_0}$ inférieur à 0,1) que l'on s'écarte d'une répartition gaussienne. Mais nous avons vu que les préparations de RNA bicaténaire contiennent toujours une faible proportion de molécules de petite taille, dont le coefficient de sédimentation est inférieur à 10S. D'autre part, les mesures de concentration sur le densitométrage, sont moins précises pour les faibles valeurs, du fait notamment de l'erreur commise dans l'estimation de la position de la ligne de base.

La détermination des différents paramètres étudiés, ρ_1 , ρ_0 , $d\rho/dr$, et M a été effectuée suivant les mêmes procédés que dans le cas du RNA du VMJN.

En faisant les moyennes des résultats obtenus à partir de nombreuses expériences, nous pouvons retenir les valeurs :

$$\rho_0 = 1,614 \text{ g/cm}^3$$

$$M = 4,1 \cdot 10^6$$

La valeur de la masse moléculaire du RNA bicaténaire, déterminée par cette méthode, est donc en bon accord avec celle obtenue à partir du coefficient de sédimentation, en utilisant la relation empirique de STUDIER.

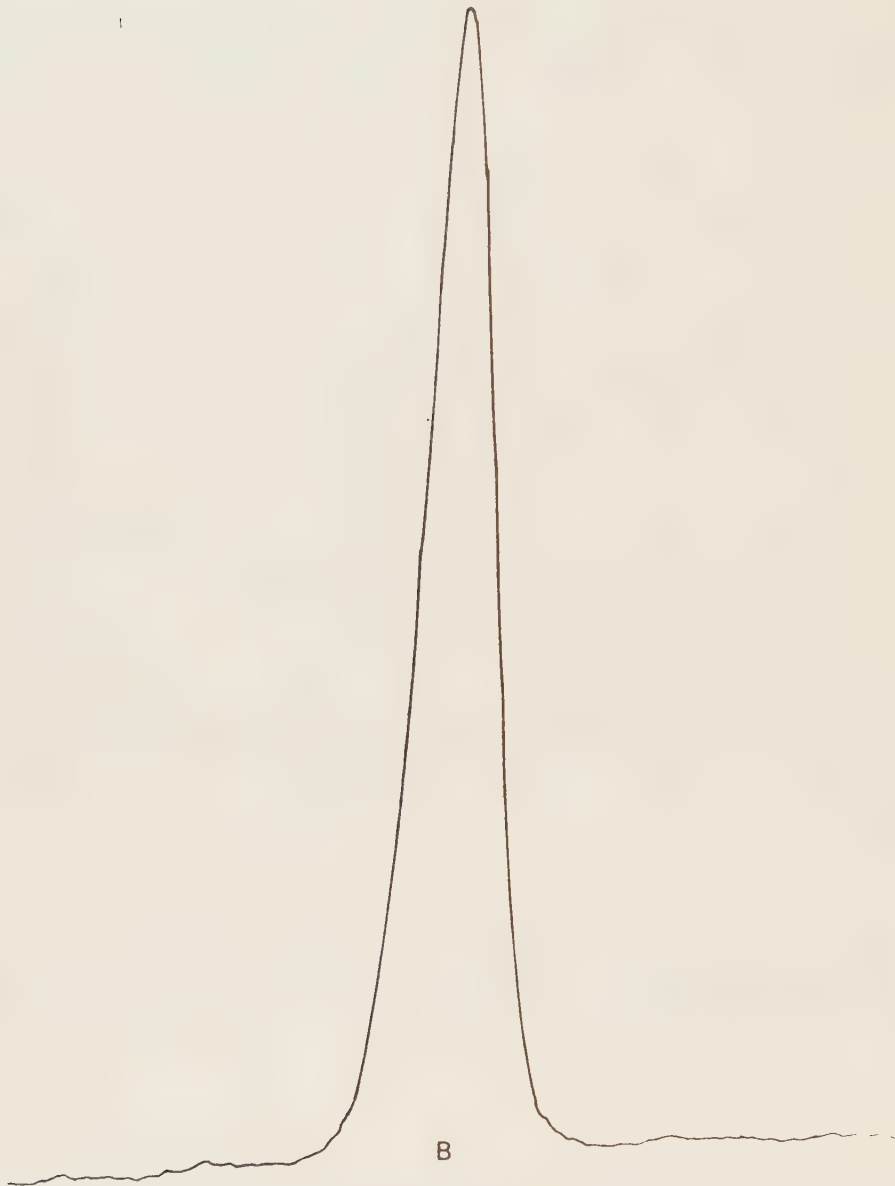


Figure 28 - Centrifugation à l'équilibre en gradient de densité de sulfate de césium, du RNA bicaténaire .

A. cliché pris après 48 heures de centrifugation à la vitesse de rotation de 37 000 t/mn et à la température de 5 °C .

B. Microdensitomètrage du cliché A .

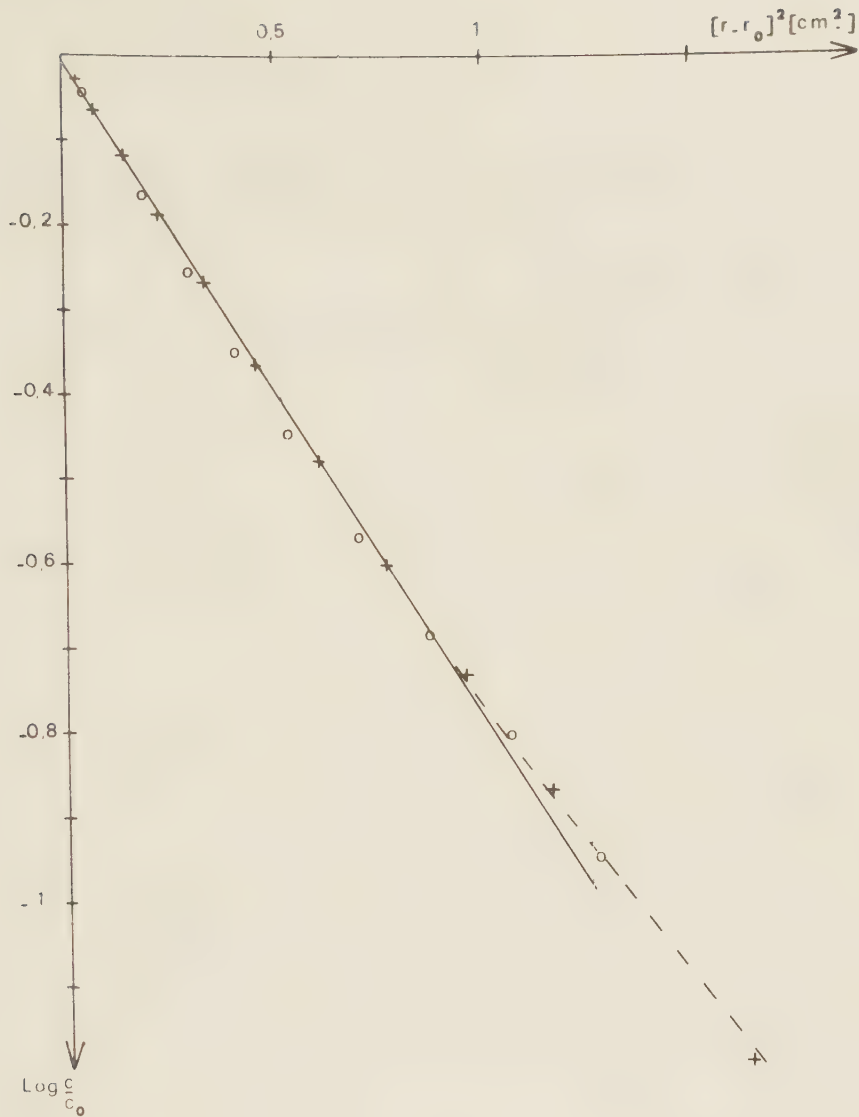


Figure 29 - Equilibre de sédimentation en gradient de sulfate de césium du RNA bicaténaire . Détermination de σ

V - 7 - 6 - TRANSITION VERS L'ETAT D'EQUILIBRE

Au cours de l'expérience d'équilibre de sédimentation, on prend un cliché de la cellule toutes les 64 mn . Pour chaque temps de centrifugation correspondant, on calcule le 2e moment de la répartition des macromolécules dans la cellule, $\mu_2(t)$, défini par la relation (12a) chap. I .

Comme nous l'avons vu précédemment, on peut déterminer le paramètre D/σ_2 à partir de la pente de la droite obtenue en portant $\log(\mu_2(t) - \mu_2(t = \infty))$ en fonction du temps (Fig. 30) .

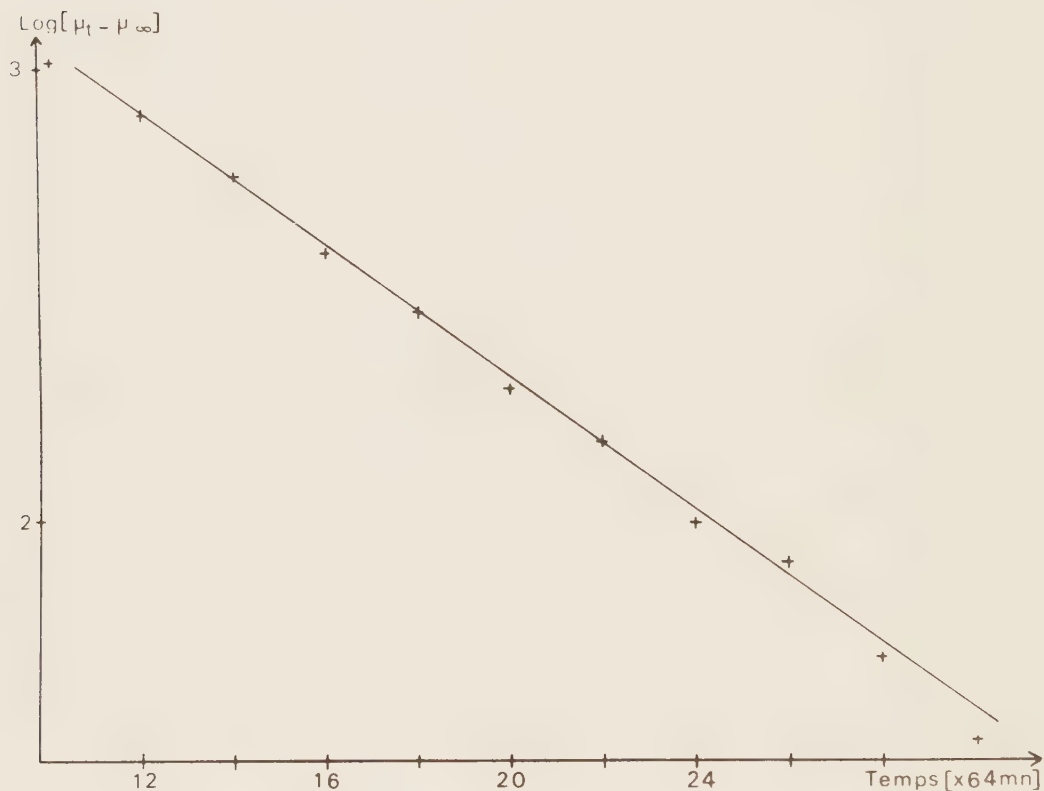


Figure 30 - Centrifugation en gradient de sulfate de césium du RNA bicaténaire ; transition vers l'état d'équilibre ; variation de $\log(\mu_2(t) - \mu_2(t = \infty))$ en fonction du temps de centrifugation .

Les résultats sont groupés sur le tableau suivant :

ω	T	β	$\frac{d\rho}{dr}$	$\frac{D}{\sigma^2}$
37020t/mn	5 ° C	$0,65 \cdot 10^9$	0,150	$2,2 \cdot 10^{-5}$

V - 8 - PROPRIETES DU COMPOSANT MINEUR B

Comme nous l'avons déjà noté, au cours de la dernière étape de purification du RNA bicaténaire par centrifugation de bande sur gradient de saccharose, nous observons, en plus du composant principal (pic A) dont les propriétés viennent d'être décrites, un composant sédimentant plus lentement (pic B) et dont la proportion est plus ou moins importante selon les préparations . Ainsi que nous l'avons montré au début de ce chapitre, ces deux fractions ont le même spectre d'absorption dans l'U.V. .

Le coefficient de sédimentation, la densité de flottation dans le sulfate de césium et la masse moléculaire de ce composant ont été déterminés selon les méthodes utilisées dans le cas du composant A . Le composant B est nettement plus polydisperse que le composant A et son coefficient de sédimentation moyen varie, selon les préparations, de 10 à 12 svedbergs . Sa densité de flottation dans le sulfate de césium est la même que celle correspondant au composant A et sa masse est de l'ordre de 10^6 daltons . Les valeurs obtenues sont rassemblées ci-dessous :

$$s = 11 \text{ svedbergs}$$

$$\rho = 1,613 \text{ g/cm}^3$$

$$M = 10^6$$

Le fait que ce RNA soit élué par du tampon sans éthanol au cours de la chromatographie sur colonne de cellulose et que sa densité soit très inférieure à celle du RNA viral montre que ce RNA possède, comme le composant A, une structure bicaténaire .

Les caractéristiques du composant B, en particulier le coefficient de sédimentation, sont à rapprocher de celles observées par RALPH (1965,1966) et par BOCKSTAHLER (1967) pour le RNA bicaténaire

qu'ils ont isolé de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN .
On peut penser que dans les deux cas, il s'agit là d'un produit de
dégradation, au cours de l'isolement, du RNA bicaténaire de poids mo-
léculaire 4.10^6 initialement .

◊

_ CHAPITRE VI _

DEGRADATION DU RNA BICATENAIRE

Les expériences que nous venons de décrire ont permis de déterminer des paramètres moléculaires importants du RNA bicaténaire . Par contre, elles ne donnent pas de renseignements sur sa structure . Toutefois, on peut noter que le RNA bicaténaire extrait de plantes infectées par le VMJN est très homogène . De plus, sa masse moléculaire est double de celle du RNA viral . Ces observations conduisent à penser que l'une au moins des deux chaînes ribonucléiques est intacte et que sa longueur est la même que celle du RNA viral . Pour essayer de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de dégradation ménagée de cette molécule par différentes méthodes et nous avons étudié les produits de cette dégradation .

VI - 1 - DEGRADATION ENZYMATIQUE

Une propriété importante des molécules ribonucléiques bicaténaires est leur résistance à l'action de la ribonucléase pancréatique en milieu de force ionique élevée (par exemple en tampon 1 SSC) alors qu'elles sont hydrolysées en milieu de concentration saline plus faible (0,1 SSC) . Cette caractéristique des RNA à double brin les distingue des RNA monocaténaires qui sont dégradés en présence de très faibles concentrations de RNase, 10^{-3} µg/ml, en milieu 1 SSC . Elle peut donc être utilisée pour mettre en évidence la présence de chaînes bicaténaires dans un mélange d'acides ribonucléiques .

BOVE (1966) a étudié la résistance du RNA bicaténaire, extrait de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN, à la RNase pancréatique par détermination de la fraction acido-insoluble après incubation en présence de l'enzyme . Cependant, cette méthode permet seulement de mettre en évidence une hydrolyse pratiquement complète des acides nucléiques, et non pas une éventuelle coupure des chaînes en fragments de taille assez importante . Aussi est-il intéressant d'utiliser des techniques qui permettent de révéler des étapes intermédiaires entre une dégradation complète et une résistance totale à l'action de la RNase .

C'est ce que nous avons fait en étudiant les produits de l'action de la RNase sur le RNA bicaténaire par ultracentrifugation analytique (vitesse de sédimentation et équilibre en gradient de densité) . Ainsi nous pouvons estimer la taille des produits de dégradation .

VI - 1 - 1 - MODE OPERATOIRE

L'enzyme utilisé (Ribonucléase A, de pancréas de boeuf, libre de protéase, Type XII A) est fournie par la firme SIGMA . Son activité spéci-

fique est de 100 unités Kunitz par mg de protéine . Il est mis en solution dans un tampon 1 SSC, à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ ou 5 $\mu\text{g/ml}$, selon les besoins .

A une suspension contenant 20 à 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA bicaténaire, en milieu 1 SSC, on ajoute 0,1 volume de RNase dont la concentration a été ajustée de façon à obtenir l'activité finale désirée . Le mélange, préparé le plus souvent directement dans la cellule de centrifugation, est incubé 30 mn à 30°C, puis ramené à la température de 5°C et immédiatement analysé . Au cours de cette étude, on utilise des concentrations en enzyme de 50, 5 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$, ce qui correspond à des molarités de 3, 0,3 et 0,03 μM , c'est-à-dire des valeurs très élevées de ces dernières .

VI - 1 - 2 - RESULTATS

- Vitesse de sédimentation

Dans une première série d'expériences, nous déterminons le coefficient de sédimentation du RNA bicaténaire traité par la RNase à différentes concentrations, ainsi que la répartition des coefficients de sédimentation $g(s)$, (Fig. 31) . Bien que les produits de la réaction soient toujours précipitables par l'acide trichloracétique (BOVE), on constate que, selon les concentrations en enzyme utilisées, les effets sont très différents .

- 0,5 $\mu\text{g/ml}$: il n'y a pas de modification sensible du coefficient de sédimentation et de la répartition $g(s)$. Sur les clichés de sédimentation, la frontière solvant-soluté est aussi nette que dans le cas du RNA non traité et on peut dire que, à cette concentration, la RNase n'a aucune action sur le RNA bicaténaire .

- 5 $\mu\text{g/ml}$: dans ce cas, on observe une faible diminution du coefficient de sédimentation moyen, qui passe de 17 S pour le RNA non traité à 16,5 S . En appliquant la relation de STUDIER, on peut évaluer à $3,7 \cdot 10^6$ daltons la masse moyenne des produits de dégradation du RNA . Cependant, on remarque que la répartition des coefficients de sédimentation présente un maximum correspondant à une valeur de 17 S (comme dans le cas du RNA témoin) et un épaulement entre 15 et 16 S . Donc, après action de la RNase, la préparation contient encore une proportion importante de molécules intactes

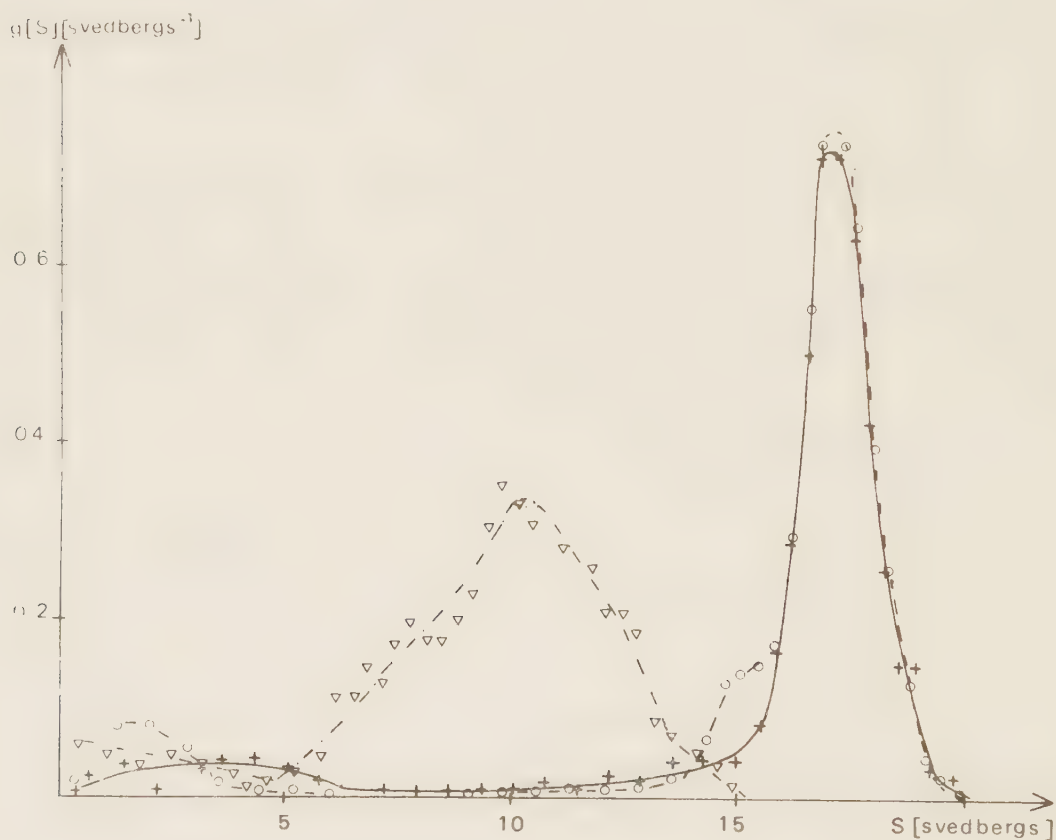


Figure 31 - Répartitions en poids des coefficients de sédimentation du RNA bicaténaire après traitement à la RNase pancréatique, à différentes concentrations, en milieu de force ionique élevée (1 SSC) .

+ - + - + - concentration en RNase : 0,5 $\mu\text{g/ml}$

o - o - o - concentration en RNase : 5 $\mu\text{g/ml}$

∇ - ∇ - ∇ - concentration en RNase : 50 $\mu\text{g/ml}$

et une fraction moindre de fragments dont le coefficient de sédimentation est compris entre 15 et 16 S et la masse, déduite de la relation de STUDIER, de l'ordre de $3,1 \cdot 10^6$ daltons . On peut penser qu'une partie des molécules de RNA ont été coupées en un fragment correspondant sensiblement aux trois quarts de la molécule initiale, et un ou plusieurs fragments beaucoup plus petits . Cependant, ces derniers n'ont pas été mis en évidence, car toutes les préparations contenaient, au départ, une fraction de faible coefficient de sédimentation .

- 50 µg/ml : lorsque le RNA bicaténaire est incubé en présence de cette concentration de RNase, la dégradation est nettement plus marquée . Le produit est hétérogène (Fig. 31) et son coefficient de sédimentation moyen varie selon les préparations entre 10 et 12 S . Les résultats sont donc, dans ce cas, beaucoup moins reproductibles que précédemment . Cependant, on peut dire que les molécules de RNA bicaténaire sont coupées, en présence d'une forte concentration en RNase pancréatique, en un petit nombre de fragments de masse encore importante . En effet, si l'on applique la relation de STUDIER, à un coefficient de sédimentation de 10 S correspond une masse de $0,9 \cdot 10^6$ daltons .

- Equilibre de sédimentation en gradient de densité

Afin de compléter les résultats obtenus lors des expériences qui viennent d'être décrites, nous avons étudié les produits de dégradation enzymatique du RNA bicaténaire par équilibre de sédimentation en gradient de densité de sulfate de césium . En effet, l'utilisation de cette méthode permet d'évaluer la taille des fragments de RNA et surtout de vérifier si ce RNA a toujours une structure bicaténaire : la densité de flottation dans le sulfate de césium d'un RNA monocaténaire est toujours nettement supérieure à celle d'un RNA bicaténaire ; ainsi que nous l'avons vu, la

valeur de ce paramètre est de $1,645 \text{ g/cm}^3$ pour le RNA du VMJN et de $1,612 \text{ g/cm}^3$ pour le RNA bicaténaire .

Après action de la RNase pancréatique, aux mêmes concentrations en enzyme et dans les mêmes conditions que lors des mesures de vitesse de sédimentation, nous avons déterminé dans chaque cas la densité de flottation des macromolécules et la largeur de la bande de RNA . Le protocole expérimental suivi pour les centrifugations (vitesse de rotation, température du rotor, densité initiale des solutions de sulfate de césium) est exactement le même que pour l'étude du RNA non traité utilisé comme témoin , et les expériences sont dépouillées de façon identique .

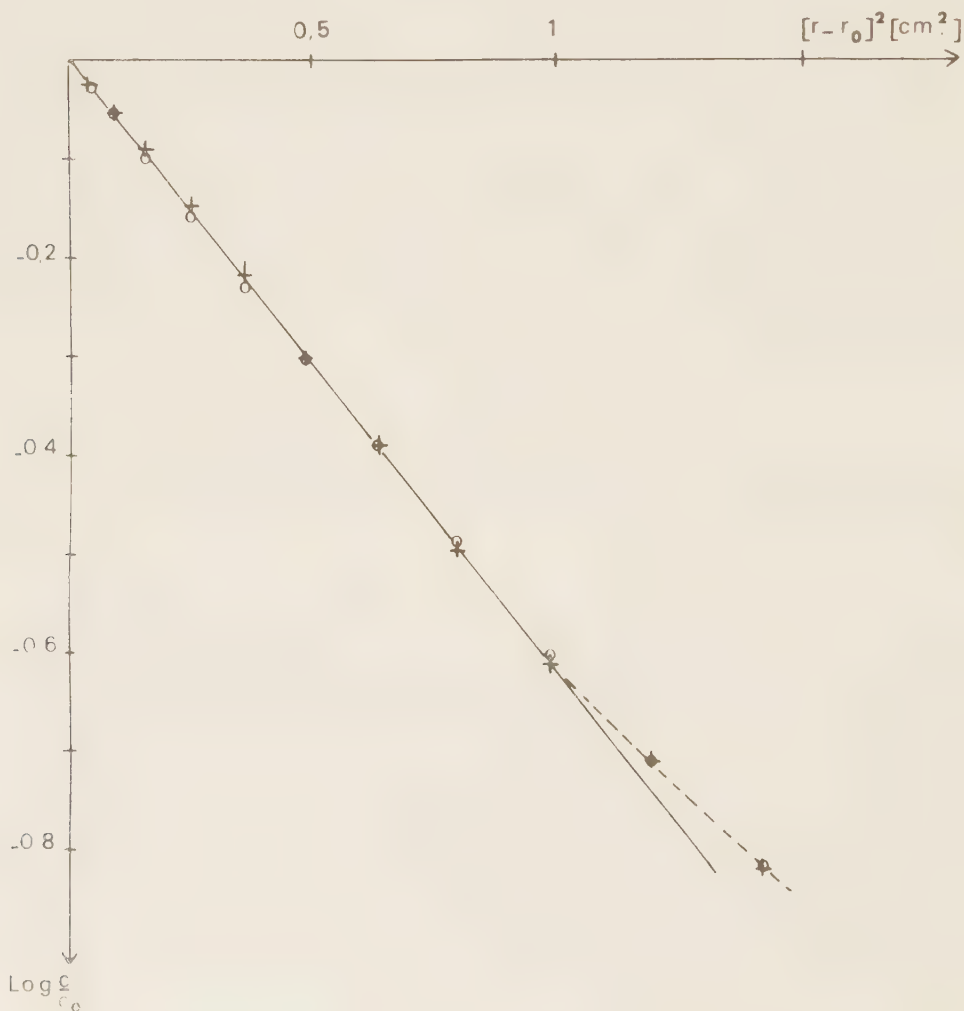


Figure 32 - Equilibre de sédimentation en gradient de densité de sulfate de césium de RNA bicaténaire après traitement à la RNase pancréatique à la concentration de $5 \mu\text{g/ml}$, en milieu 1 SSC . Détermination de σ

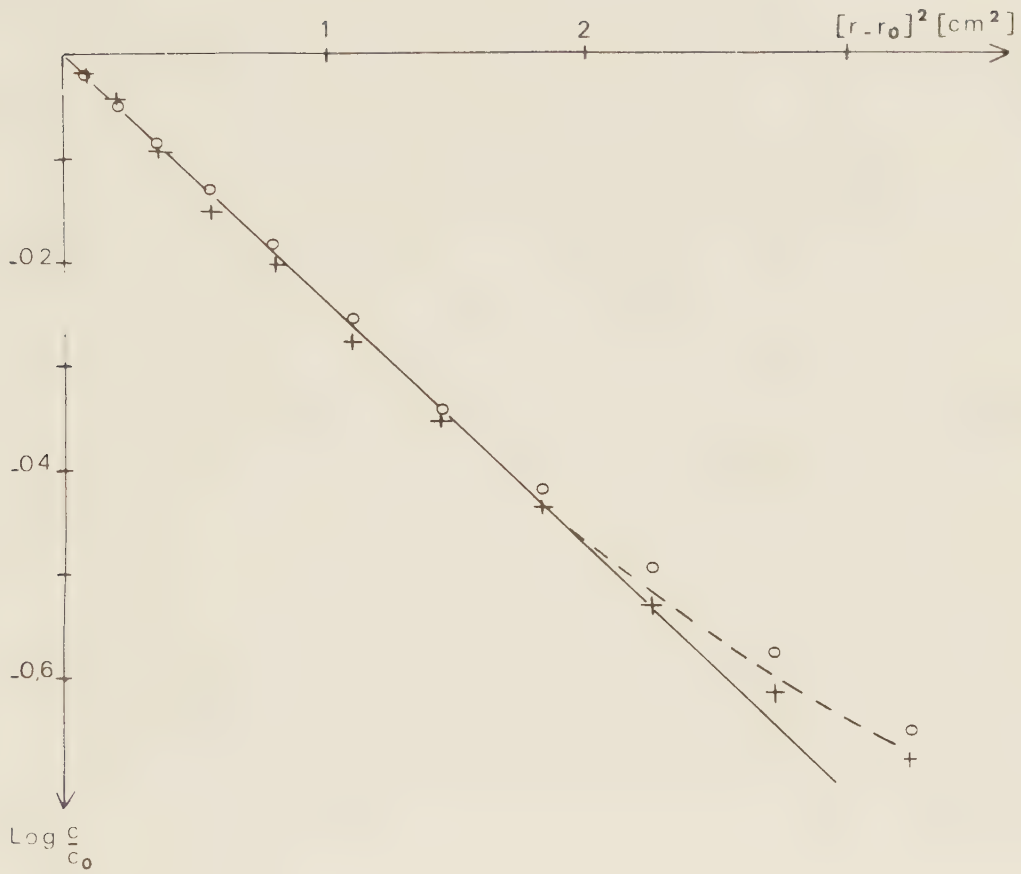


Figure 33 - Equilibre de sédimentation en gradient de densité de sulfate de césium de RNA bicaténaire après traitement à la RNase pancréatique à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, en milieu 1 SSC . Détermination de σ

Lorsque la concentration en RNase est de 0,5 µg/ml, on n'observe aucun effet de l'enzyme et les résultats, tant en ce qui concerne la densité de flottation que la masse moléculaire et l'homogénéité du RNA sont identiques à ceux obtenus avec le RNA témoin . Par contre, lorsque le RNA est incubé en présence de RNase à la concentration de 5 µg/ml, l'action de l'enzyme est sensible . En effet, lorsque l'on porte $\text{Log} \left(\frac{c}{c_0} \right)$ en fonction de $(r - r_0)^2$, on n'obtient une droite que pour les valeurs du paramètre c/c_0 supérieures à 0,2, ce qui montre que le RNA traité dans ces conditions est moins homogène que le RNA natif (Fig. 32) . La largeur de la bande de macromolécules, caractérisée par le paramètre σ^2 , déterminée à partir de la pente de cette droite, est plus élevée que dans le cas du RNA témoin, ce qui correspond, toutes choses égales par ailleurs, à une masse moléculaire de $3,6 \cdot 10^6$, mais la densité de flottation dans le sulfate de césium du RNA traité est la même que celle du RNA témoin .

Enfin, lorsque le RNA bicaténaire est traité par la RNase à la concentration de 50 µg/ml, le produit obtenu est plus polydisperse que dans le cas précédent, comme le montre la Fig. 33 . La valeur de σ^2 est beaucoup plus élevée et la masse moyenne des fragments de RNA est de $1,1 \cdot 10^6$ daltons ; par contre, leur densité de flottation est identique à celle du RNA témoin .

$C_{\text{RNase}} (\mu\text{g/ml})$	0	0,5	5	50
$\rho_0 \text{ (g/cm}^3\text{)}$	1,612	1,614	1,609	1,614
M_0/M		1,03	1,20	3,65
M		$4 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$
S	17,0	17,0	16,5	12

Les résultats les plus significatifs de l'étude de la dégradation du RNA bicaténaire par la RNase pancréatique, en milieu de force ionique élevée (1 SSC) sont résumés dans le tableau ci-dessus . On constate que le RNA est dégradé de façon notable pour une forte concentration d'enzyme : 50 $\mu\text{g/ml}$. Les molécules de RNA bicaténaire sont alors coupées en un petit nombre de fragments dont la masse moyenne est de l'ordre de 10^6 daltons . Les écarts entre les valeurs respectives de la densité de flottation dans le sulfate de césium du RNA bicaténaire et de ses produits de dégradation par la RNase à différentes concentrations sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales, par conséquent ne sont pas significatifs . On peut donc conclure que les fragments de RNA ont la même densité que le RNA non traité et qu'ils ont toujours une structure bicaténaire . En effet, si les deux chaînes étaient désappariées, on observerait une augmentation de leur densité de flottation et surtout, en présence d'une concentration en RNase aussi élevée elles seraient totalement hydrolysées .

Notons que des molécules de RNA, dont la masse est de l'ordre de 10^6 daltons, sont précipitées par l'acide trichloracétique . Ainsi, si l'on étudie la résistance du RNA bicaténaire à la ribonucléase, uniquement en déterminant, après la réaction, la fraction acido-insoluble, on n'observe aucun effet .

En conclusion, la molécule de RNA bicaténaire, dont la masse est de 4.10^6 daltons, est coupée par la RNase pancréatique, à forte concentration et en milieu de force ionique élevée . Nous avons montré qu'il se produit une séparation en quatre fragments de structure bicaténaire, dont la masse moyenne est de $1,1.10^6$ daltons . On peut donc penser que cette molécule présente un petit nombre (3 en moyenne) de sites sensibles à la RNase .

Comme nous l'avons déjà indiqué, les préparations de RNA bicaténaire sont très homogènes et la valeur moyenne de la masse moléculaire de ce RNA est égale au double de celle du RNA viral . Ceci conduit à supposer que l'une au moins des deux chaînes ribonucléiques est continue et a la même longueur que la molécule de RNA viral . Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de séparer les deux chaînes complémentaires du RNA bicaténaire, à la fois par dégradation thermique et chimique, et nous avons étudié les produits ainsi obtenus .

VI - 2 - DENATURATION THERMIQUE

VI - 2 - 1 - PRINCIPE

L'appariement des deux chaînes du RNA bicaténaire est assuré par des liaisons hydrogènes entre paires de bases complémentaires . Une élévation de la température provoque la rupture de ces liaisons et la séparation des deux chaînes ribonucléiques . La température de fusion T_m (correspondant par définition à la rupture de 50 % des liaisons hydrogène entre chaînes ribonucléiques) dépend du pourcentage en bases guanine et cytosine du RNA et de la force ionique du solvant . A pH neutre, la température T_m augmente de 15°C lorsque la concentration en ions Na^+ est multipliée par 10 ; en d'autres termes, ces deux facteurs sont liés par la relation (MICHELSON et coll , 1966) :

$$\frac{\Delta T_m}{\Delta \text{Log}[\text{Na}^+]} = 15 \quad (15)$$

De plus, on explique la variation de la température de fusion avec le contenu du RNA en bases G-C par le fait que la liaison A-U est plus labile que la liaison G-C . Ainsi, en milieu 0,1 SSC, la température T_m du complexe ribonucléique bicaténaire poly rA - poly rU serait, en appliquant la relation (15), $44,5^{\circ}\text{C}$, alors que celle du composé poly G - poly C serait de 130°C .

Enfin, pour un RNA bicaténaire quelconque, la température de fusion est proportionnelle à son contenu en bases G-C .

Le paramètre T_m du RNA bicaténaire extrait de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN a été déterminé expérimentalement (GUSCHLBAUER et coll., 1968) dans différentes conditions . Les valeurs obtenues, 93°C en milieu 0,1 SSC et 106°C en milieu 1 SSC sont en bon accord avec celles que l'on peut calculer pour un complexe bicaténaire dont l'une des chaînes serait du RNA du VMJN, et qui contiendrait donc 55,3 % de paires de bases G-C . L'aspect des courbes de fusion est caractéristique d'une structure fortement organisée . En effet, le phénomène s'accompagne d'une hyperchromicité importante et surtout, il se produit dans un intervalle de température très réduit : en milieu 0,1 SSC, 80 % de l'augmentation de la densité optique a lieu entre 90°C et 96°C , alors que dans le cas des RNA monocaténaires la transition est beaucoup moins brusque . Nous avons donc repris ces expériences afin d'étudier les produits de la fusion .

VI - 2 - 2 - *MODE OPERATOIRE*

Deux fractions aliquotes de RNA bicaténaire, à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ environ, en milieu 0,1 SSC, sont portés à 100°C , durant 10mm, en tubes scellés . On a vu que dans ces conditions, ce RNA est totalement dénaturé . Le premier tube est refroidi brusquement . Dans le deuxième tube, on porte la concentration saline à 1 SSC et on maintient la solution, durant 30 mm, à 25°C en dessous du point de fusion, soit 80°C . Dans ces conditions, les chaînes complémentaires peuvent se réapparier . Les produits de fusion ou de réappariement après fusion du RNA bicaténaire sont alors étudiés par ultracentrifugation analytique : on détermine le coefficient de sédimentation des acides nucléiques ainsi traités .

VI - 2 - 3 - *RESULTATS*

Les densitométrages des clichés de sédimentation correspondant

respectivement au RNA refroidi brusquement après fusion et au RNA renaturé sont représentés sur la Fig. 34 . On peut noter que les produits obtenus sont dans les deux cas très polydisperses . Les valeurs respectives des coefficients de sédimentation moyens, ramenées aux conditions standard, des deux préparations sont très différents :

RNA dénaturé : $S_{20,W} = 18,9$

RNA dénaturé, puis renaturé $S_{20,W} = 12,8$

Le coefficient de sédimentation du RNA dénaturé est donc plus élevé que celui du RNA renaturé et même que celui du RNA natif .

A partir de ces courbes, nous avons calculé, pour chacune des préparations, les répartitions intégrales $C(s)$ des coefficients de sédimentation, $C(s)$ étant la concentration totale des molécules dont le coefficient de sédimentation est inférieur ou égal à s (Fig. 35) . Comme on peut le constater dans le cas du RNA dénaturé, une fraction encore importante du soluté a un coefficient de sédimentation supérieur à 20 S, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur de celui du RNA viral . Par contre, dans les préparations de RNA dénaturé, puis renaturé, on ne trouve pratiquement pas de composant dont le coefficient de sédimentation soit supérieur à 17 S .

Ces expériences permettent de penser que les préparations de RNA bicaténaire contiennent des chaînes ribonucléiques dont la longueur est de l'ordre de grandeur de celle du RNA viral . Si l'on tient compte de plus des résultats obtenus lors de l'étude de la dégradation enzymatique de ce RNA, on peut concevoir la molécule de RNA formée d'une chaîne continue, de poids moléculaire égal à celui du RNA viral, et de quelques fragments dont la masse moyenne est de l'ordre de $5 \cdot 10^5$. En effet, nous

avons vu que la RNase, à forte concentration, coupe la molécule de RNA bicaténaire en segments de masse moyenne $1,1 \cdot 10^6$. Comme ces segments sont bicaténaires, chacune des deux chaînes qui les constituent a une masse de $5 \cdot 10^5$ daltons.



Figure 34 - Ultracentrifugation analytique de RNA bicaténaire traité à la chaleur. Microdensitomètrage des clichés obtenus après 30 mn de centrifugation à la vitesse de 50 700 t/mn et à la température de 5 °C. A - RNA bicaténaire porté 10 mn à 100 °C, puis 30 mn à 80 °C B - RNA bicaténaire porté 10 mn à 100 °C, puis refroidi brusquement.

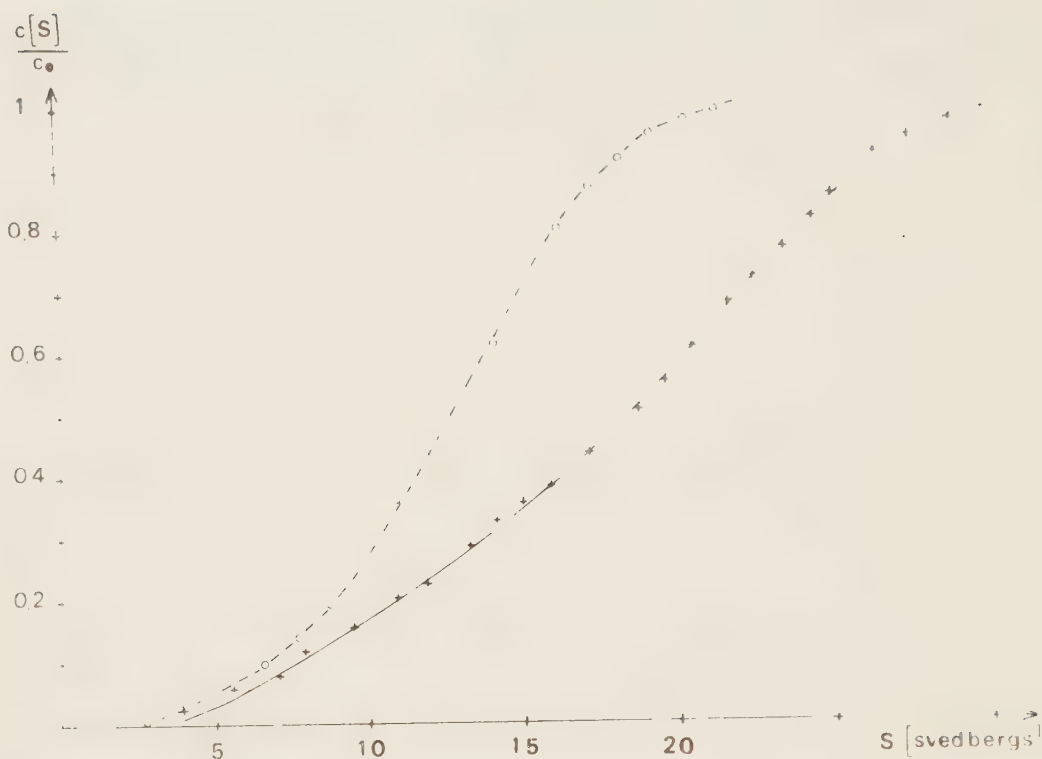


Figure 35 - Répartition intégrale, $\frac{c(s)}{c_0}$, des coefficients de sédimentation de RNA bicaténaire traité à la chaleur .

o - o - o RNA bicaténaire porté 10 mn à 100° C, puis 30 mn à 80° C

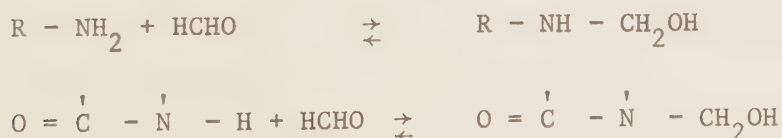
+ - + - + RNA bicaténaire porté 10 mn à 100° C puis refroidi brusquement

La molécule du RNA bicaténaire serait donc formée de deux chaînes ribonucléiques, l'une continue, l'autre fragmentée en un petit nombre de segments selon le schéma ci-dessous, ces chaînes complémentaires étant appariées par liaisons hydrogène entre les bases guanine et cytosine d'une part, uridine et adénine d'autre part .

Il faut toutefois remarquer qu'on ne trouve dans les produits de fusion du RNA bicaténaire que relativement peu de molécules ayant la taille du RNA viral, c'est-à-dire un coefficient de sédimentation de l'ordre de 23 S . On aurait pu s'attendre à ce que les produits de dégradation thermiques soient plutôt formés de 50 % de matériel homogène, correspondant à des chaînes ayant la longueur du RNA viral, et 50 % de matériel hétérogène formé de chaînes beaucoup plus courtes . Mais, dans les conditions de dénaturation du RNA bicaténaire, (10mm à 100 °C), la probabilité de rupture de la liaison phospho-diester qui assure la continuité de la chaîne ribonucléique n'est pas négligeable . Ce phénomène peut rendre compte des résultats que nous avons obtenus . En d'autres termes, la proportion de molécules de la taille du RNA viral que nous observons ne peut être qu'inférieure à leur proportion réelle, à cause de la rupture d'une fraction des chaînes ribonucléiques au cours du traitement .

VI - 3 - ACTION DE LA FORMALDÉHYDE

Afin de confirmer les hypothèses concernant la structure du RNA bicaténaire que les résultats de la dégradation thermique nous avaient conduit à formuler, nous avons cherché une autre méthode permettant de séparer les chaînes complémentaires . Il nous est apparu qu'un bon moyen serait l'action de la formaldéhyde . En effet, ce composé réagit avec les groupements aminés des bases que comportent les acides nucléiques, dans la mesure où celles-ci sont accessibles et non engagées dans des liaisons hydrogène entre bases complémentaires . Cette réaction conduit à la formation de dérivés méthylol (FELDMAN, 1973) suivant les schémas :



Les bases ainsi formylées ne peuvent participer à la constitution de structures bicaténares . Ainsi, la formaldéhyde provoque un abaissement de la température de fusion des acides nucléiques et, en présence de ce réactif, il ne peut y avoir réappariement des chaînes complémentaires . Afin de vérifier si l'une des deux chaînes du RNA bicaténaire a la taille du RNA viral, nous avons comparé la taille de ces deux RNA après action de la formaldéhyde, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide .

VI - 3 - 1 - MODE OPERATOIRE

Le mode opératoire est celui proposé par BOEDTKER (1968) . On utilise une solution de formaldéhyde à 35 % (MERCK pour analyse) dont la concentration est amenée à 33 % par addition de tampon phosphate disodique 0,45 M, phosphate monosodique 0,05 M. A un volume de RNA, dont la concentration est de 20 à 30 µg/ml, on ajoute 0,1 volume de formaldéhyde à 33 % . La solution de RNA, molaire en aldéhyde formique, est alors incubée 10 mn à 30°C, puis refroidie brusquement . Après addition de saccharose, l'échantillon est déposé sur gel de polyacrylamide et soumis à électrophorèse . Les gels sont ensuite analysés à l'aide d'un lecteur de gel Joyce-Loebl .

Afin de vérifier si les chaînes ribonucléiques sont monocaténares, on étudie l'action de la RNase sur les RNA ainsi traités, en milieu de force ionique élevée, 1 SSC, et en milieu de force ionique plus faible, 0,1 SSC . Pour ce faire, après lecture, les gels sont rincés dans des tubes de 50 cm³, contenant du tampon 1 SSC, pendant au moins 8 heures, le tampon étant changé plusieurs fois , afin d'éliminer le SDS qui inhiberait la RNase . Le tampon est alors complété en RNase à 2 µg/ml . Les pores des gels utilisés ont une taille suffisante pour que la RNase puisse diffuser dans le gel et éventuellement hydrolyser le RNA . Après

quelques heures d'incubation en présence de RNase, les gels sont analysés, puis agités de nouveau en milieu 0,1 SSC et de nouveau soumis à l'action de la RNase, à la même concentration que précédemment . Des renseignements plus précis peuvent être obtenus en étudiant l'action de la formaldéhyde sur du RNA bicaténaire marqué au ^{32}P . En effet, nous avons indiqué précédemment qu'au cours de la réaction de synthèse in vitro le nucléotide marqué est incorporé essentiellement dans la chaîne "plus" du complexe bicaténaire . L'estimation de la taille des fragments de RNA marqués, après traitement à la formaldéhyde permettra donc de déterminer la nature de la chaîne entière du RNA bicaténaire, (chaîne virale ou chaîne complémentaire) .

Les expériences effectuées dans ce cas sont menées exactement dans les mêmes conditions que pour le RNA non marqué .

VI - 3 - 2 - RESULTATS

En ce qui concerne la mobilité électrophorétique, on constate (Fig. 36) que le RNA viral migre nettement moins vite après traitement à la formaldéhyde . Ce résultat n'est pas surprenant, car après formylation la structure tertiaire de la molécule de RNA est détruite . L'encombrement de la molécule est donc plus important qu'avant traitement et sa mobilité est moindre . Dans les mêmes conditions d'électrophorèse, (concentration du gel, durée, tension) le RNA viral formylé migre moins vite que le RNA bicaténaire natif . Par contre, après action de la formaldéhyde sur le RNA bicaténaire, on observe sur le gel un composé qui migre à la même vitesse que le RNA viral traité de la même façon . Ceci laisse à penser que les chaînes ribonucléiques respectives de ces deux composés ont même longueur . Ces résultats, portés sur les Fig. 36 et 37 sont explicités dans le tableau suivant :

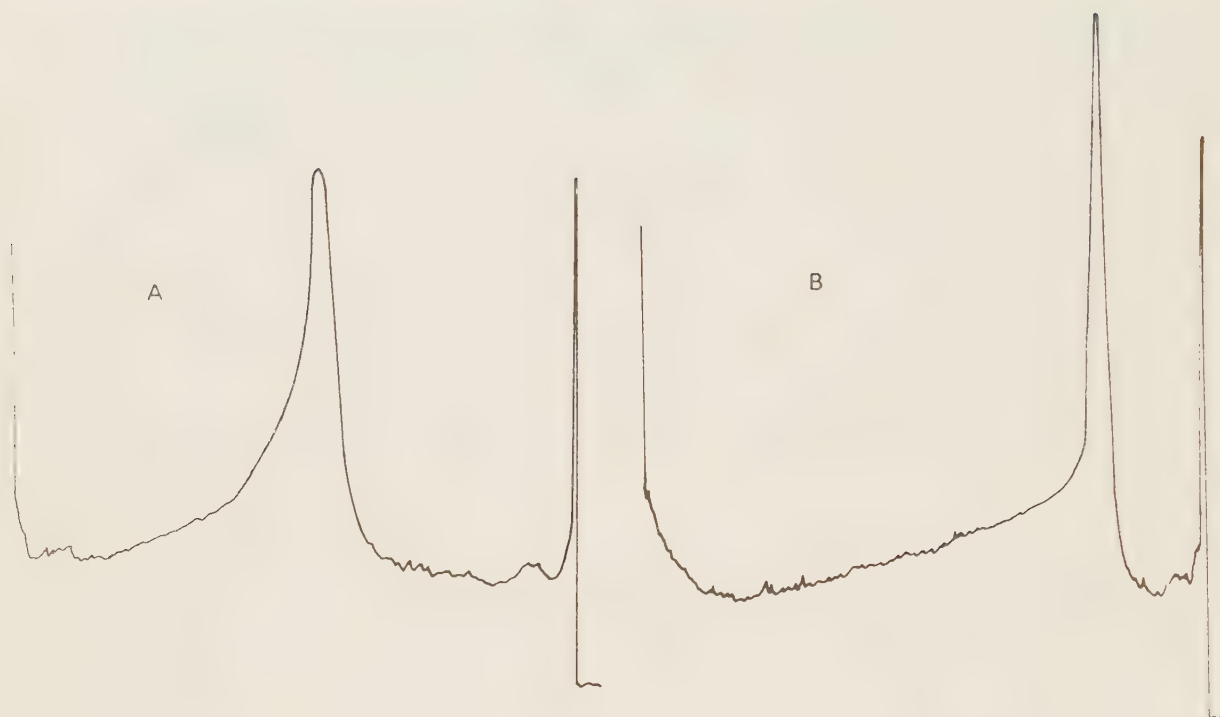


Figure 36 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, à 2 %
de RNA du VMJN .

A. RNA témoin

B. RNA traité à la formaldéhyde

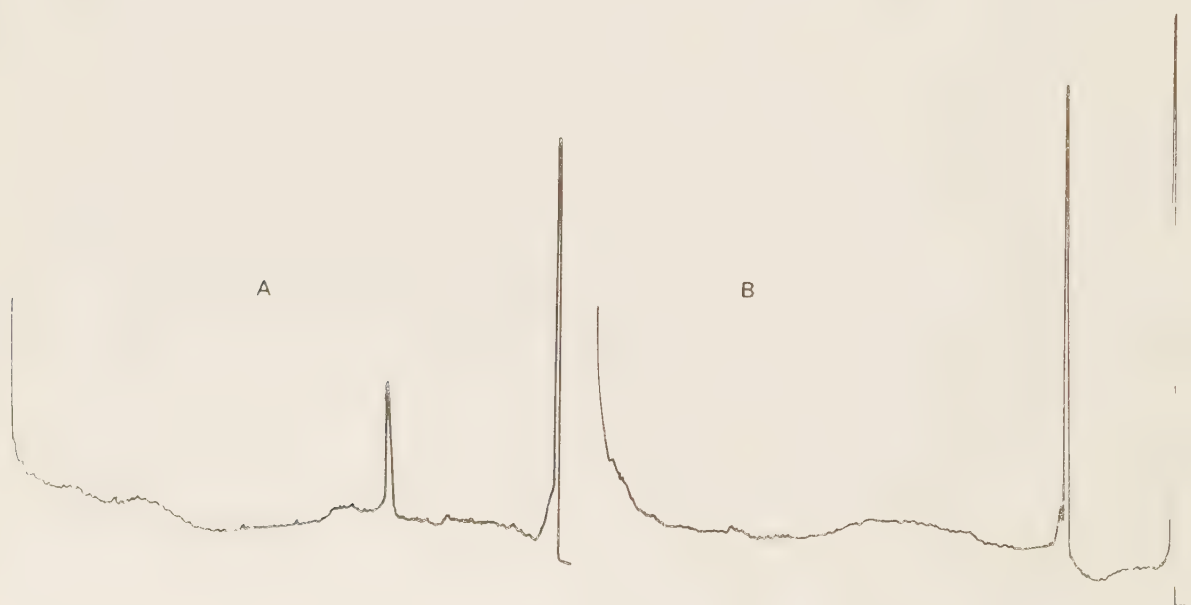


Figure 37 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, à 2 %
de RNA bicaténaire .

A. RNA témoin

B. RNA bicaténaire traité à la formaldéhyde

	RNA viral non traité	RNA bic. non traité	RNA viral traité	RNA bic. traité
Distance de migration	4,5	3,5	2,1	2,1

De plus, la méthode utilisée pour mettre en évidence l'hydrolyse d'un RNA dans le gel lui-même, donne les résultats attendus dans le cas du RNA viral et du RNA bicaténaire non traités. Après rinçage des gels en présence de RNase en milieu 1 SSC, on peut noter que le pic correspondant au RNA viral a disparu, donc que le RNA a été hydrolysé et que les produits d'hydrolyse ont diffusé hors du gel, alors que le pic correspondant au RNA bicaténaire n'est pas modifié (Fig. 38). Ce dernier pic disparaît après action de la RNase en milieu 0,1 SSC.

Après action de la formaldéhyde, le RNA bicaténaire tout comme le RNA viral est hydrolysé par la RNase en milieu 1 SSC (Fig. 38). Ceci montre qu'après traitement à la formaldéhyde, les deux chaînes ribonucléiques ont été désappariées et que le pic observé sur l'enregistrement des gels après électrophorèse correspond à un RNA monocaténaire. Comme ce RNA a la même mobilité que le RNA viral formylé, on peut en conclure qu'il a la même taille. Cependant, ces résultats ne permettent pas de savoir si les chaînes entières observées correspondent à du RNA viral, à du RNA "moins" ou à un mélange des deux composants. Des expériences réalisées à l'aide de RNA marqué au ^{32}P au cours d'une synthèse in vitro permettent de répondre à cette question.

Dans le cas où l'on utilise du RNA bicaténaire marqué, les gels, après avoir été densitométrés, sont coupés en tranches de 2 mm

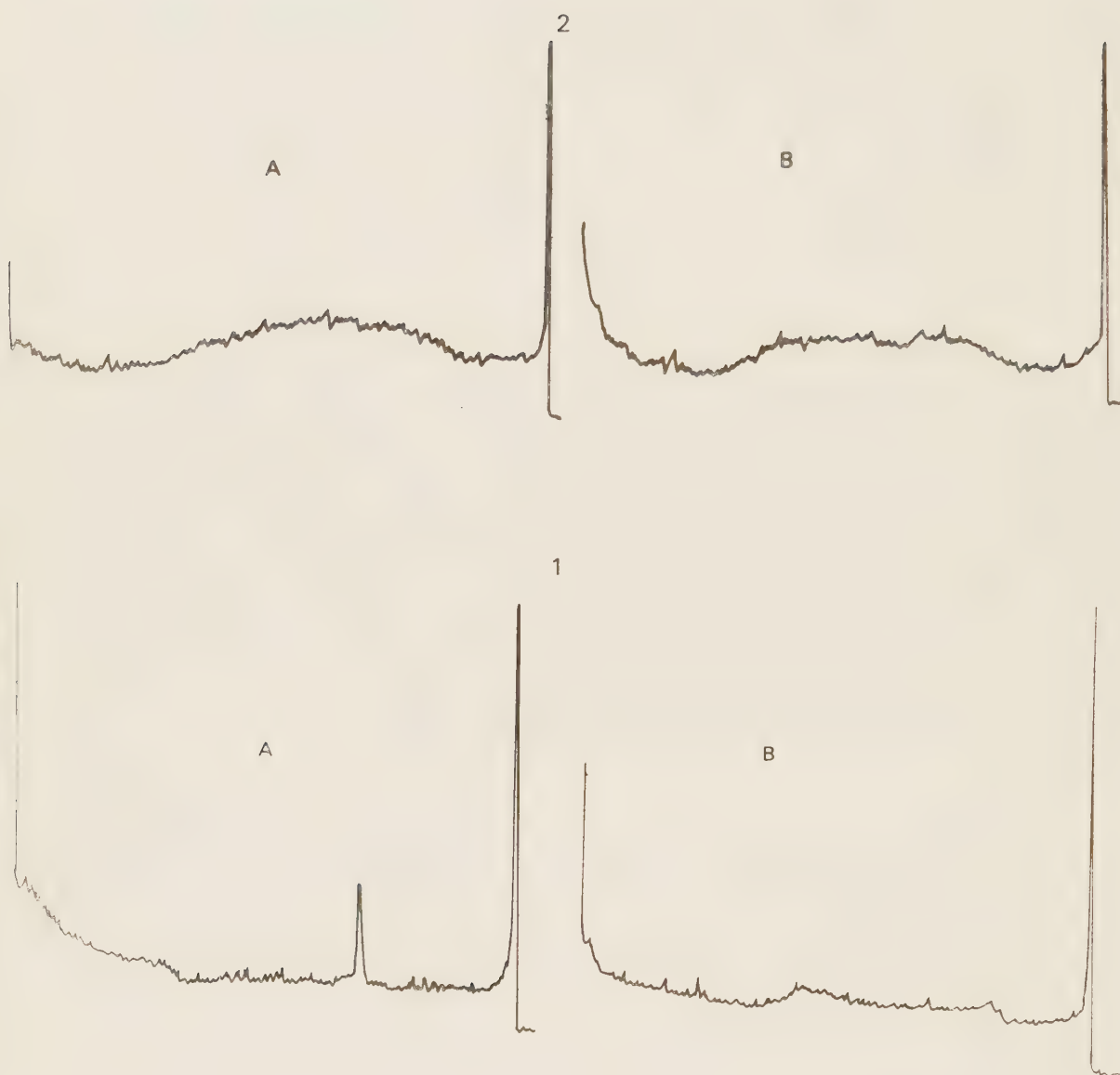


Figure 38 - Action de la RNase pancréatique, à la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, sur le RNA bicaténaire, après électrophorèse (figure 37)

38 - 1 Action de la RNase en milieu 1 SSC

A. RNA témoin

B. RNA bicaténaire traité à la formaldéhyde

38 - 2 Action de la RNase en milieu 0,1 SSC

A. RNA témoin

B. RNA bicaténaire traité à la formaldéhyde

d'épaisseur, et la radioactivité de chaque tranche est comptée, par effet CERENKOV, à l'aide d'un compteur à scintillation .

La figure 39 représente les enregistrements de la densité optique et la radioactivité de gels correspondant respectivement au RNA bicaténaire traité et non traité à la formaldéhyde . En ce qui concerne le RNA non traité, le pic de densité optique coïncide avec le pic de radioactivité . Par contre, dans le cas du RNA bicaténaire traité à la formaldéhyde, on observe un pic de densité optique, migrant avec la même vitesse que le RNA formylé, et du matériel migrant plus rapidement . Le point important à noter est que la radioactivité correspond, non pas au composant ayant la taille du RNA viral, mais au matériel migrant plus rapidement .

BOVE (1967) a démontré qu'au cours de la synthèse in vitro , la radioactivité est incorporée presque exclusivement dans la chaîne "plus" du RNA bicaténaire . Le fait que, après traitement à la formaldéhyde, la radioactivité soit associée à des fragments de RNA dont la taille est nettement inférieure à celle du RNA viral, alors que les chaînes entières ne sont pas marquées, suggère fortement que, dans le complexe bicaténaire, c'est la chaîne "plus" qui est fragmentée, alors que la chaîne "moins" est entière et a la même taille que le RNA viral .

En conclusion, après fusion en présence de formaldéhyde, le RNA bicaténaire devient hydrolysable par la RNase en milieu 1 SSC ; les chaînes complémentaires ne sont donc plus appariées . Par ailleurs, dans ces conditions, il est converti en deux composants . D'une part un composant homogène migre avec la même mobilité électrophorétique que le RNA viral formylé et n'est pas marqué au cours de la synthèse in vitro ; il s'agit donc vraisemblablement d'une chaîne ribonucléique ayant la même longueur que le RNA viral, mais de séquence complémentaire . D'autre part, une population de molécules hétérogènes migrent plus rapidement que le RNA viral

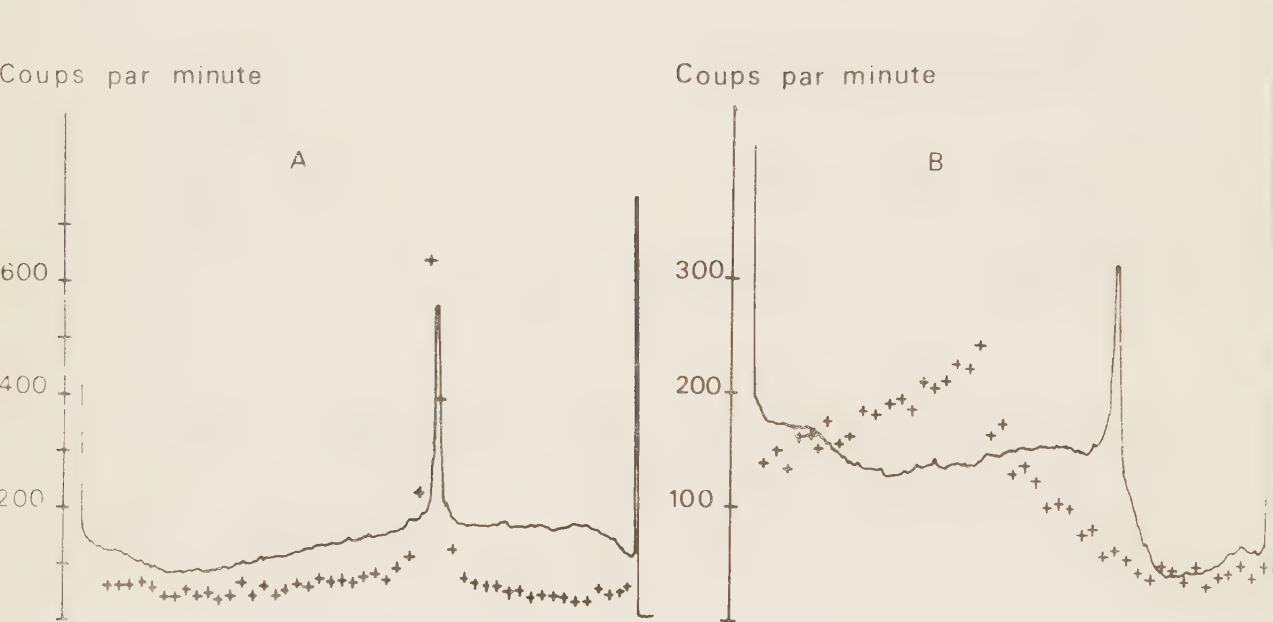


Figure 39 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de RNA bicaténaire marqué au ^{32}P .

A. RNA témoin

B. RNA bicaténaire traité à la formaldéhyde

formylé, donc sont de taille inférieure . Le fait que ces fragments de RNA soient marqués prouve qu'il s'agit de segments de RNA viral "plus", puisqu'il a été démontré qu'au cours de la synthèse in vitro, la radioactivité est incorporée pratiquement dans le seul RNA "plus" .

Ces résultats sont en accord avec le modèle proposé : la molécule de RNA bicaténaire, isolée à partir de la fraction acellulaire 100 P₂ 10000 (V) de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN est formée par l'appariement, sur toute sa longueur, d'une molécule de RNA "moins" entière avec un petit nombre de fragments du RNA "plus" segmenté .

Il n'est pas exclu qu'une partie du RNA bicaténaire étudié soit du type "FR" (forme répllicative), c'est-à-dire que, tant la chaîne "plus" que la chaîne "moins" soit continue. On aurait alors un mélange de molécules de ce type.



Cependant, cette hypothèse est difficilement compatible avec les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de l'action de la RNase pancréatique sur le RNA bicaténaire . En effet, des molécules telles que (b) offrent des points d'attaque à la RNase, puisqu'elles comportent de courts segments monocaténaires, alors que des molécules telles que (a) , étant totalement bicaténaires, sont protégées .

- DISCUSSION -

I - PREPARATION DU RNA BICATENAIRE

Le point de départ de cette préparation est la fraction subcellulaire 100 P₂ 10.000 (V), sédimentant entre 100 et 10 000 g, obtenue à partir de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN. Cette fraction est susceptible d'incorporer, in vitro, les quatre ribonucléosides tri-phosphate dans une structure ribonucléique bicaténaire. Il est ainsi possible de réaliser, in vitro, la synthèse d'un fragment de RNA viral, comportant 100 à 200 résidus nucléotidiques en un ou plusieurs segments. Cette réaction est probablement la continuation de la synthèse in vivo, les ribonucléotides étant incorporés dans la chaîne "plus", (BOVE, 1967) au niveau des molécules replicase (schéma a).

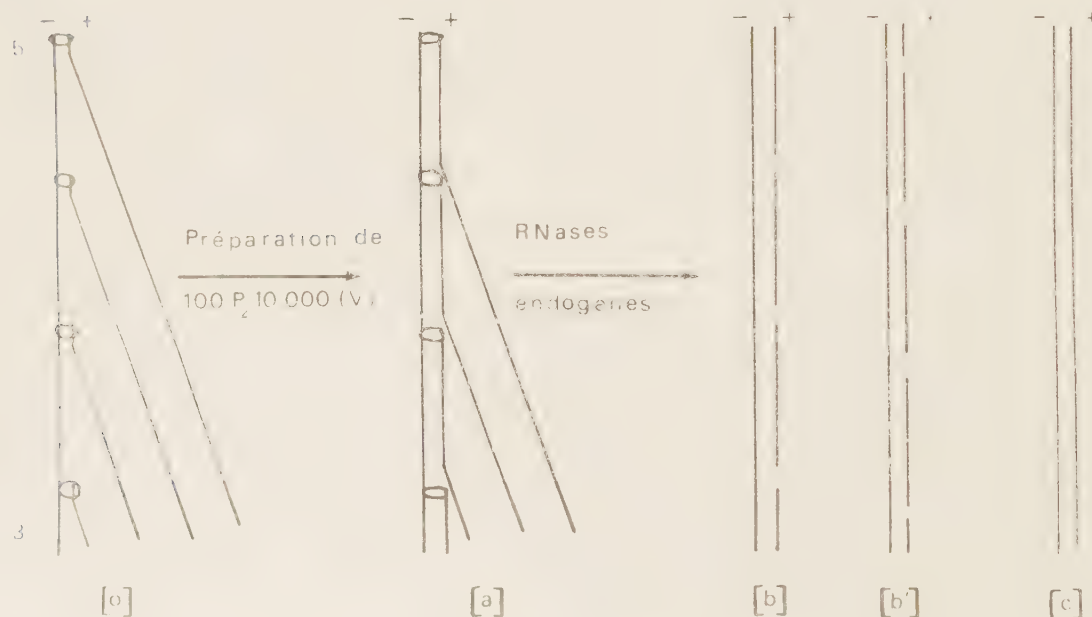
Le RNA bicaténaire que nous avons étudié est obtenu à partir de cette préparation 100 P₂ 10 000 (V) soit directement, soit après synthèse in vitro. Les produits isolés dans ces deux cas, ne diffèrent que par 100 à 200 résidus nucléotidiques sur les quelques 13 000 que comporte la molécule. Cette différence n'est pas sensible aux méthodes d'analyse que nous avons utilisées et, tant en vitesse de sédimentation qu'en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ils se comportent de façon identique.

II - STRUCTURE DU RNA BICATENAIRE ISOLE

En milieu 1 SSC, la RNase pancréatique, à la concentration de 0,5 µg/ml,

n'a aucun effet sur le RNA bicaténaire que nous avons isolé alors que dans les mêmes conditions, les RNA monocaténaires sont totalement hydrolysés. De plus, les expériences de centrifugation analytique et d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide montrent que ce RNA bicaténaire est très monodisperse. Ces résultats nous permettent de conclure que le RNA bicaténaire préparé à partir de la fraction 100 P₂ 10 000 (V) est totalement bicaténaire et ne comporte pas de parties monocaténaires.

Il faut noter que, *in vivo*, l'intermédiaire de replication semble ne comporter que peu de partie bicaténaire, la chaîne "moins" matricielle et la chaîne "plus" en voie de synthèse n'étant reliées par des liaisons hydrogènes qu'au niveau même de la replicase virale (schéma o). Par contre, dès le broyage des feuilles infectées pour l'obtention de la préparation 100 P₂ 10 000 (V) et avant extraction des acides nucléiques au phénol, la matrice ribonucléique et les molécules en voie de synthèse semblent s'être appariées par liaison hydrogène (schéma a) ; l'intermédiaire de replication possède dès lors une colonne vertébrale bicaténaire, suivant le schéma (a).



Dans les conditions où nous opérons, nous n'avons pas observé de molécules telles que (a) car pendant la préparation de la fraction 100 P₂ 10 000, les RNases endogènes hydrolysent très certainement les parties monocaténares et forment des molécules du type (b) ou (b').

Il n'est pas exclu que les préparations de RNA bicaténaire contiennent, en plus des molécules de type (b), des molécules formées d'une chaîne virale "plus" et d'une chaîne "moins", toutes les deux entières. Dans le cas des bactériophages, on peut mettre en évidence, in vivo, des molécules de type (o) ; cependant, HOFSCHNEIDER (1973) a montré que l'on trouve, en fin d'infection, in vivo des molécules de type (c) et il semble que de telles molécules ne soient pas fonctionnelles. Toutefois, le fait que la RNase pancréatique, à la concentration de 50 µg/ml et en milieu 1 SSC, coupe la molécule de RNA bicaténaire en un petit nombre de fragments (4 segments de masse moyenne 10⁶ daltons) laisse penser que cette molécule présente quelques sites sensibles à la RNase, ce qui est plus en accord avec une structure du type (b).

III - INTEGRITE DE LA CHAINE "MOINS"

La très grande homogénéité du RNA bicaténaire isolé à partir de la fraction 100 P₂ 10 000 (V), s'explique très bien si l'on suppose que l'une des deux chaînes ribonucléiques est intacte et a la longueur du RNA viral. Ce dernier point est en accord avec la valeur obtenue pour la masse du RNA bicaténaire, 4,1.10⁶ daltons, double de celle du RNA du VMJN. Cette hypothèse est confirmée par l'étude des produits de dénaturation par la chaleur du RNA bicaténaire et par l'analyse de ce RNA après formylation.

En effet, après dénaturation du RNA bicaténaire, par chauffage à 100°C en milieu 1 SSC et refroidissement brusque, on obtient un produit hétérogène, mais contenant plus de 20 % de matériel ayant un coefficient de sédimentation supérieur à 20 S, donc du même ordre de grandeur que celui du RNA viral. De même, après action de la formaldéhyde sur le RNA bicaténaire, dans des conditions de température moins élevées (80°C) mais où il peut y avoir effectivement formylation des fonctions aminées des chaînes ribonucléiques, on observe, en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, un composé homogène, ayant la même

mobilité que le RNA viral formylé et comme lui hydrolysable par le RNase pancréatique en milieu 1 SSC.

Si la même expérience est réalisée avec du RNA bicaténaire préparé après synthèse *in vitro*, en présence d'UTP marqué au ^{32}P , on constate qu'après action de la formaldéhyde, le composé ayant la même mobilité que le RNA viral formylé n'est pratiquement pas marqué alors que la radioactivité est associée à des composés ayant une mobilité beaucoup plus grande. Or, la radioactivité est incorporée essentiellement dans la chaîne "plus". On peut donc conclure que la chaîne "plus" du complexe bicaténaire est fragmentée en plusieurs segments et que la chaîne "moins" est entière et a la même taille que le RNA viral.

IV - LE VMJN N'EST PAS UN VIRUS A GENOME SEGMENTE

L'étude du RNA du VMJN a montré qu'il ne présente pas de coupures masquées par des ions divalents : l'EDTA ne provoque pas de dégradation de ce RNA. La différence entre nos résultats et ceux décrits par d'autres auteurs (STRAZIELLE et coll., 1965) peut s'expliquer par un mode de préparation différent du RNA. En effet, dans la particule virale, le RNA est relativement mal protégé et il nous a paru nécessaire de préparer les virions et le RNA immédiatement après la récolte des feuilles infectées prélevées à un stade peu tardif de l'infection. De plus, après incubation en présence de formaldéhyde 1 M, pendant 10 mn à 63°C, le RNA du VMJN ne présente pas de dégradation importante. Ceci indique que, dans nos préparations de RNA viral, on ne trouve pas une proportion importante de molécules présentant des coupures masquées par des liaisons hydrogène, car dans nos conditions expérimentales, la structure tertiaire des molécules de RNA monocaténaires est totalement détruite (BOEDTKER, 1968, FELMANN, 1973) et d'éventuelles coupures masquées seraient révélées. Ainsi, les préparations de RNA du VMJN que nous avons obtenues semblent être formées surtout de molécules intactes, de masse moléculaire égale à 2.10^6 .

Par ailleurs, il est possible d'extraire de la préparation 100 P₂ 10 000 (V), un RNA bicaténaire contenant très certainement des chaînes "moins" entières, de même taille que le RNA viral. Ces faits indiquent fortement que, contrairement à la suggestion de PLEIJ (1973), le VMJN n'est pas un virus à génome segmenté.

- RESUME ET CONCLUSION -

I - VIRUS DE LA MOSAIQUE JAUNE DU NAVET : QUELQUES PROPRIETES DU RNA VIRAL

Le RNA du VMJN, extrait de virions fraîchement purifiés, a été étudié par différentes méthodes physiques. Son spectre d'absorption dans l'U.V. est caractéristique d'un acide nucléique. L'ultracentrifugation analytique et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permettent de vérifier qu'il est très homogène. Son coefficient de sédimentation est de 24 S en milieu tris 0,01 M et de 28 S en milieu phosphate 0,1 M. En utilisant différentes techniques d'analyse, (ultracentrifugation analytique, électrophorèse, centrifugation en gradient de saccharose) il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet spécifique de l'EDTA sur ce RNA, ce qui semble montrer que les molécules de RNA du VMJN ne présentent pas de coupures masquées par des ions divalents. La stabilité à la chaleur du RNA du VMJN est supérieure à celle que l'on pourrait attendre sur la base des résultats antérieurs (BOEDTKER, 1963 ; HASELKORN, 1964). Après 10 mn à 60°C, la taille du RNA du VMJN semble ne pas être modifiée. Pour des températures de traitement supérieures à 60°C, une partie des molécules est dégradée, en proportion d'autant plus importante que la température de traitement est plus élevée. Cependant, même après 10 mn à 100°C, il reste des chaînes intactes d'après leur comportement en électrophorèse. Enfin, la formylation de ce RNA (10 mn à 63°C en milieu de formaldéhyde 1 M)

ne provoque la dégradation que d'une faible fraction du RNA de VMJN. Si les préparations de VMJN que nous avons obtenues contiennent des molécules présentant des coupures masquées par des liaisons hydrogène, ce ne peut être qu'en faible proportion.

II - RNA BICATENAIRE

Nous avons isolé à partir de feuilles de chou de Chine infectées par le VMJN, et plus particulièrement à partir de préparation 100 P₂ 10 000 (V) un RNA bicaténaire spécifique de l'infection virale. Après hydrolyse des DNA, les acides nucléiques sont extraits par traitement de la préparation au phénol. La séparation de ce RNA bicaténaire des RNA monocaténaires de la plante a été effectuée, non pas par hydrolyse de ces derniers par la ribonucléase pancréatique qui, même en milieu de force ionique élevée n'est pas sans effet sur le RNA bicaténaire, mais par chromatographie de rétention sur colonne de cellulose. Nous avons obtenu ainsi du RNA bicaténaire, dont les principales propriétés sont les suivantes :

- son spectre d'absorption dans l'U.V. est caractéristique d'un acide nucléique.

- son coefficient de sédimentation en milieu 1 SSC, est de 17,0 S.

- il est très homogène, comme le montrent les expériences de centrifugation analytique et d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

- sa structure est bien celle d'un RNA bicaténaire, en double hélice. Des expériences de diffraction des rayons X ont permis de le vérifier et de montrer que le pas de l'hélice est de 29,5 Å° et la distance entre les paires de bases consécutives de 2,85 Å° (en collaboration avec ALBISER).

- sa densité de flottation dans le sulfate de césium est celle d'un RNA bicaténaire : 1,614 g/cm³, par rapport à celle du RNA viral : 1,648 g/cm³ d'un RNA bicaténaire.

- sa masse moléculaire a été déterminée à la fois à partir du coefficient de sédimentation, des données conjointes de la microscopie électronique et de la diffraction des rayons X, et de la centrifugation en gradient de densité. Les résultats obtenus à l'aide de ces différentes méthodes sont en bon accord et conduisent à la valeur de 4,1.10⁶.

- en milieu 0,1 SSC, le RNA bicaténaire est sensible à la RNase pancréatique : le produit formé après incubation en présence de RNase à la concentration de 0,5 µg/ml a un coefficient de sédimentation de 4,5 S.

- en milieu 1 SSC, le RNA bicaténaire est totalement résistant à la RNase à faible concentration (0,5 µg/ml). Il est partiellement dégradé par la RNase à forte concentration, 50 µg/ml. Dans ce dernier cas, la molécule de RNA bicaténaire est coupée, en moyenne, en quatre fragments dont la masse moyenne est de 10^6 daltons et dont la structure est toujours bicaténaire, comme le montre la valeur de leur densité de flottation dans le sulfate de césium, identique à celle du RNA bicaténaire intact.

- après fusion à la chaleur, à 100°C en milieu 0,1 SSC, les produits de dénaturation du RNA bicaténaire sont très hétérogènes. Cependant, ils contiennent 30 % de matériel dont le coefficient de sédimentation est supérieur à 20 S ce qui laisse supposer que le RNA bicaténaire contient des chaînes ribonucléiques dont la taille est de l'ordre de grandeur de celle du RNA viral.

- la présence de formaldéhyde permet de dénaturer le RNA bicaténaire à une température de 80°C. Les produits de dénaturation, formylés, comportent un type de molécules ayant la même mobilité électrophorétique, donc la même taille, que le RNA viral formylé. Si l'expérience est réalisée à l'aide de RNA bicaténaire marqué au ^{32}P dans la chaîne "plus" au cours d'une synthèse in vitro, la radioactivité est associée à des composants ayant une mobilité électrophorétique nettement inférieure à celle du RNA viral formylé alors que le composant de la taille du RNA viral n'est pas marqué.

Le fait que le RNA du VMJN contienne une forte proportion de chaînes entières, et que le RNA bicaténaire extrait de la préparation 100 P₂ 10 000 (V), spécifique de l'infection virale, comporte des chaînes "moins" entières, de même taille que le RNA viral, suggère fortement que le VMJN n'est pas un virus à génôme divisé.

ABREVIATIONS

ATP :	5' triphosphate d'adénosine
CMP :	- de cytidine
GMP :	- de guanosine
UMP :	- d'uridine
DNA :	acide désoxyribonucléique
DNase :	désoxyribonucléase
RNA :	acide ribonucléique
RNase :	ribonucléase
VMJN :	virus de la mosaïque jaune du navet
VMT :	virus de la mosaïque du tabac
tris :	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
EDTA :	acide éthylène diamine tétracétique
β M.E. :	β - mercaptoéthanol
SDS :	lauryl sulfate de sodium
TCA :	acide trichloracétique
nm :	nanomètre
mn :	minute
sec :	seconde
cpm:	coups par minute
t/mn :	tours par minute
s :	coefficient de sédimentation
S :	svedberg
ρ :	densité

COMPOSITION DES TAMPONS LES PLUS UTILISES

TB 9 : Tris 0,05 M, pH 9

MgCl₂ 0,008 M

β M.E. 0,009 M

TB 7,4 : Tris 0,05 M, pH 7,4

MgCl₂ 0,008 M

β M.E. 0,009 M

NaT : Tris 0,05 M, pH 7,2

NaCl 0,15 M

STE : Tris 0,05 M, pH 7,2

NaCl 0,1 M

EDTA 0,001 M

SSC : NaCl 0,15 M

Citrate de sodium 0,015 M

- BIBLIOGRAPHIE -

- AMMAN, J., DELIUS, H. et HOFSCHEIDER, P. (1964)

Isolation and properties of an intact specific replicative form of RNA
phage M 12

J. molec. Biol., 10 (1964) 557-561

- ARNOTT, S., WILKINS, M. H. F., FULLER, W. et LANGRIDGE, R. (1967)

Molecular and crystal structures of double helical RNA

II - Determination and comparison of diffracted intensities for the
and crystalline forms of reovirus RNA and their interpretation in
terms of groups of the three RNA molecules .

J. molec. Biol. 27 (1967) 525-533

III - An 11 - fold molecular model and comparison of the agreement between
the observed and calculated three dimensionnal diffraction data for 10 and
11 - fold models .

J. molec. Biol., 27 (1967) 535-548

- ARNOTT, S. (1970)

The geometry of nucleic acids

Progress in Biophysics and Molecular Biology

vol. 21, Pergamon Press (1970) 265-319

- BALTIMORE, D., BECKER, Y. et DARNELL, J. E. (1964)

Virus specific double stranded RNA in poliovirus infected cells.

Science, 143 (1964) 1034-1036

- BALTIMORE, D. (1966)

Purification and properties of poliovirus double stranded ribonucleic acid .

J. molec. Biol., 18 (1966) 421-428

- BANCROFT, J. B. et KEY, J. L. (1964)

Effect of actinomycin D and ethylene diamine tetracetic acid on the multiplication of a plant virus in etiolated say beam hypocotyls .

Nature, 202 (1964) 729-730

- BISHOP, D. H. L., CLAYBROOK, J. R. et SPIEGELMAN, S. (1967)

Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels .

J. molec. Biol., 26 (1967) 373-387

- BOCKSTÄHLER, L. E. (1967)

Biophysical studies on double stranded RNA from turnip yellow mosaic virus infected plants .

Molec. gen. Genetics, 100 (1967) 337-348

- BOEDTKER, H. (1967)

The reaction of ribonucleic acid with formaldehyde - Optical absorbance studies .

Biochemistry, 6 n°9 (1967) 2718-2727

- BOVE, J. M., BOVE, C., RONDOT, M. J et MOREL, G. (1965)

Chloroplasts and virus RNA synthesis

Biochemistry of chloroplasts. Proc. NATO adv. stud. Inst. A berystwyth,
Aug. 1965, vol. 2 Ed. GOODWIN, T. W. Acad. Press, London and New-York
(1965) 329-339

- BOVE, J.M. (1967)

Virus de la mosaïque jaune du navet : synthèse asymétrique in vitro d'un
segment de RNA viral .

Thèse de doctorat ès Sciences . Paris - 1967

- BOVE, J. M., BOVE, C. et MOCQUOT B. (1968)

Turnip yellow mosaic virus - RNA synthesis in vitro : evidence for native
double stranded RNA .

Biochem. Biophys. Res. Commun, 32 (1968) 480-486

- BOVE, J. M., ASTIER, T., BARREAU, C., BOVE, C., DUPONT, G., FAHLUN, J.,
GARNIER, M., LATRILLE, J., MOUCHES, C., RICARD, B. et RIGOLOT, C. (1974)

Turnip yellow mosaic virus - RNA replication in chinese cabbage .

First Intersectionnal Congress of the International Association
of microbiological societies . Tokyo (1974)

- BROWN, F. et CARTWRIGHT, B. (1964)

Virus specific ribonucleic acid in baby hamster kidney cells infected with
footh - and mouth disease virus

Nature, 204 (1964) 855 - 856

- BUKRINSKAYA, A. G. et ZHDANOV, V. M. (1963)

Shortening by actinomycin D of latent period of multiplication of Sendai virus .

Nature, 200 (1963) 920-921

- BURDON, R. H., BILLETER, M. A., WEISSMANN, C., WARNER, R. C., OCHOA, S.
et KNICHT, C. A. (1964)

Replication of viral RNA . V - Presence of a virus specific double stranded RNA in leaves infected with tobacco mosaic virus .

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 52 (1964) 768-775

- CHARLOT, G. (1961)

Les methodes de la chimie analytique . Analyse quantitative minérale .

Ed. Masson (1961) 735

- COHEN, S. S. et SCHACHMAN, H. K. (1957)

Physical studies on the RNA of TYMV

Virology, 3 (1957) 575-586

- DORNE, B., JONARD, G., WITZ, J. et HIRTH, L. (1971)

Interactions of mercuric chloride with TYMV : dissociation of the virus and reassociation of the reaction products .

Virology, 43 (1971) 279-290

- DUNN, B. et HITCHBORN, J. H. (1965)

The use of bentonite in the purification of plant viruses .

Virology, 25 (1965) 171-192

- DUPONT, G. et HORN, P. (1968)

Etude de la structure de l'acide ribonucléique du virus de la mosaïque jaune du navet .

C. R. Acad. Sci., 266 (1968) 2234-2236

- EASON, R., CLINE, M. J. et SMELLIE, R. M. S. (1963)

Ribonucleic acids in virus infected and uninfected Krebs II ascites tumor cells .

J. Biol. Chem., 238 (1963) 3978-3984

- ELIAS, H. G. (1964)

Méthodes de l'ultracentrifugation analytique

Ed. offset - Litho Jean Genoud . Lausanne (1964)

- ERIKSON, R. L., FENWICK, M. L. et FRANKLIN, R. M. (1964)

Replication of bacteriophage RNA : studies on the fate of parental RNA

J. molec. Biol., 10 (1964) 519-529

- ERIKSON, R. L. (1966)

Fractionnation of viral specific ribonucleic acid by cesium sulfate equilibrium density gradient sedimentation

J. molec. Biol., 18 (1966) 372-381

- FEIX, G., SLOR, H. et WEISSMANN, C. (1967)

Replication of viral RNA, XIII the early product of phage RNA synthesis in vitro

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. 57 (1967) 1401-1408

- FEIX, G., POLLET, R. et WEISSMANN, C. (1968)

Replication of viral RNA, XVI enzymatic synthesis of infectious viral RNA with non infectious Q minus strands as template

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. 59 (1968) 145-152

- FELDMAN, M. Y. (1973)

Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde

Progress in nucleic acids research and molecular biology, vol. 13, Academic Press, New-York (1973)
1-44

- FENWICK, M. L., ERIKSON, R. L. et FRANKLIN, R. N. (1964)

Replication of the bacteriophage R 17

Science, 146 (1964) 527-530

- FRANKLIN, R. M. et BALTIMORE, D. (1963)

Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus infected mammalian cells

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Synthesis and Structure of macromolecules, vol. 27, Ed. Cold Spring Harbor, L. I., New-York (1963) 175-195

- FRANKLIN, R. M. (1966)

Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R 17

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 55 (1966) 1504-1511

- FRANKLIN, R. M. (1967 a)

Replication of bacteriophage ribonucleic acid : some physical properties
of single stranded, double stranded and branched viral ribonucleic acid

J. of Virology, 1 (1967) 64-75

- FRANKLIN, R. M. (1967 b)

Replication of bacteriophage ribonucleic acid : some properties of native
and denatured replicative intermediate

J. of Virology, 1 (1967) 514-522

- FRIEDMAN, R. M. et SONNABEND, J. A. (1965)

Inhibition by interferon of production of double stranded Semliki Forest
virus ribonucleic acid

Nature 206 (1965) 532

- GARNIER, M (1975)

Thèse de 3^o cycle . Université de Bordeaux II
(1975)

- GESTERLAND, R. F. et BOEDTKER, H. (1964)

Some physical properties of bacteriophage R 17 and its ribonucleic acid

J. molec. Biol., 8 (1964) 496-507

- GIERER, A. et SCHRAMM, G. (1956)

Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus

Nature, 77 (1956) 702-703

- GIGOT, C. et HIRTH, L. (1965)

Existence d'une fraction de RNA résistant à la ribonucléase dans les feuilles de *Brassica Chinensis* infectées par le virus de la mosaïque jaune du navet

C. R. Soc. Biol., 159 (1965) 1437-1441

- GIGOT, C., PHILLIPS, G. et HIRTH, L. (1965)

Propriétés des acides ribonucléiques extraits des feuilles de *Brassica Chinensis* infectées par le virus de la mosaïque jaune du navet

Bull. Soc. Chim. Biol., 47 (1965) 1667-1676

- GOLDBERG, R. J. (1953)

Sédimentation in the ultracentrifuge

J. Phys. Chem., 57 (1953) 194

- GRUNBERG-MANAGO, M. et GROS, F. (1964)

Remarques sur les caractéristiques des ARN messagers et sur le code génétique

Bull. Soc. Chim. Biol., 46 (1964) 1441-1497

- GLSCHLBAUER, W., COURTOIS, Y., BOVE, C. et BOVE, J. M. (1968)

Optical investigations on double stranded ribonucleic acid from turnip yellow mosaic virus

Molec. gen. Genetics, 103 (1968) 150-158

- HASELKORN, R. (1962)

Studies on infectious RNA from turnip yellow mosaic virus

J. molec. Biol. 4 (1962) 357-367

- HAYWOOD, A. M. et SINSHEIMER, R. L. (1963)

Inhibition of protein synthesis in E. Coli protoplasts by actinomycin D

J. molec. Biol., 6 (1963) 247-249

- HIRTH, L., HORN, P. et STRAZIELLE, C. (1965)

Structure et propriétés de l'ARN extrait du virus de la mosaïque jaune
du navet

J. molec. Biol., 13 (1965) 720-734

- HIRUKI, C. et KAESBERG, P. (1965)

Double stranded replicative form of RNA from barley plants infected with
brome grass mosaic virus

Phytopathology, 55 (1965) 1061

- HIRUKI, C. (1969)

Properties of single and double stranded ribonucleic acid from barley plants infected with brome grass mosaic virus

J. Virology, 3 (1969) 498-505

- HOF SCHNEIDER, P. (1968)

Replication of RNA viruses

Proceedings of the first international congress
for Virology - Helsinki (1968) 39-41

- HOF SCHNEIDER, P. (1972)

Proceedings of the Symposium on nucleic acids
and proteins in higher plants . Hungary (1972)

- HOMMA , M. et GRAHAM, A.F. (1962)

Synthesis of mengo viral ribonucleic acid in L cells .

Biochim. biophys. Acta, 61 (1962) 642-644

- HORN, P., HIRTH, L. et CANALS, P. (1963)

Détermination de la masse moléculaire du virus de la mosaïque jaune du navet .

Ann. Inst. Pasteur 105 (1963) 99-102

- HUPPERT, J. et SEMMEL, M. (1965)

Suppression de l'activité ribonucléasique par la pronase

Biochim.biophys. Acta, 108 (1965) 501-503

- IFFT, J. B., MARTIN, W. R. et KINZIE, K. (1970)

Densities gradient proportionnality constants for a number of aqueous binary solutions

Biopolymers, 9 (1970) 597-614

- JACKSON, A. O., MITCHELL, D. M. et SIEGEL, L. A. (1971)

Replication of TMV . Isolation and characterization of D S forms of RNA

Virology, 45 (1971) 182-191

- KAERNER, H. C. et HOFFMANN-BERLING, H. (1964 a)

Synthesis of double stranded RNA in RNA phage infected Escherichia Coli cells .

Nature 200 (1964) 1012-1013

- KAERNER, H. C. et HOFFMANN- BERLING, H. (1964 b)

Die Bildung von RNS-Doppel Strang zur Vermehrung eines RNS enthaltenden
Backteriophagen .

Z. Naturforsch., 19 b (1964) 593-604

- KAPER, J. M. et SIBERG, R. A. (1969)

Degradation of turnip yellow mosaic virus by freezing and thawing in vitro :
a new method for studies on the internal organization of the viral components
and for isolating native RNA .

Virology, 38 (1969) 407-413

- KAPER, J. M. et WATERWORTH , H. E. (1973)

Comparison of molecular weights of single stranded viral RNAs by two empirical
methods .

Virology 51 (1973) 183

- KATZ, L. et PENMAN, S. (1966)

The solvent denaturation of double stranded RNA from poliovirus infected
HeLa cells .

Biochem. biophys. Res. Commun., 23 (1966) 557-560

- KEIL, T. U. et HOFSCHEIDER, P. H. (1973)

Secondary structure of RNA phage M 12 replicative intermediates in vivo .

Biochem. biophys. Acta, 312 (1973) 297-310

- KELLY, R. B., SINSHEIMER, S. G. (1964)

A new RNA component in MS 2 infected cells .

J. molec. Biol., 8 (1964) 602-605

- KINGSBURY, D. W.

Use of actinomycin D to unmask RNA synthesis induced by newcastle disease virus .

Biochem. biophys. Res. Commun., 9 (1962) 156-161

- KLUG, A., LONGLEY, N. et LEBERMAN, R. (1966)

Arrangement of protein subunits and the distribution of nucleic acid in TYMV .

J. molec. Biol., 15 (1966) 315-343

- KUNITZ, M. (1946)

A spectrophotometric method for the measurement of Ribonuclease activity .

J. biol. Chem. 164 (1946) 563-588

- KURLAND, C. G.

Purification of ribosomes from Escherichia Coli .

Methods in Enzymology vol. 20 partc. p. 379

- LAFLECHE, D. et BOVE, J. M. (1971)

Virus de la mosaïque jaune du navet : site cellulaire de la réplication du RNA viral .

Physiologie végétale, 9 (1971) 487-503

- LAFLECHE, D., BOVE, C., DUPONT, G., MOUCHES, C., ASTIER, T., GARNIER, M.
et BOVE, J. M. (1972)

Site of viral RNA replication in the cells of higher plants : TYMV-RNA synthesis
on the chloroplasts outer membrane system .

F.E.B.S. Meeting - Amsterdam 27 (1972) 43-72

- LEVY, H. B., SNELLBAKER, L. F. et BARON, S. (1963)

Studies on mechanism of action of interferon

Virology, 21 (1963) 48-55

- LOENING, U. E. et INGLE, J. (1967)

Diversity of RNA components in green plant tissues .

Nature, 215 (1967) 363-367

- LOENING, U. E. L. (1967)

The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide
gel electrophoresis

Biochem. J., 102 (1967) 251-257

- LOENING, U. E. (1968)

Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution

J. molec. Biol., 38 (1968) 355-365

- LOZERON, H. et SZYBALSKI, W. (1966)

Suppression of RNA precipitation during Cs_2SO_4 density gradient centrifuga-
tion .

Biochem. biophys. Res. Commun., 23 (1966) 612-618

- MANDEL, H. G., MATTHEWS, R. E. F., MATUS, A. et RALPH, R. K. (1964)

Replicative form of plant viral RNA

Biochem. biophys. Res. Commun., 16 (1964) 604-609

- MATTHAEI, J. H. et NIRENBERG, M. W. (1961)

Characteristics and stabilization of DNase-sensitive protein synthesis in

E. Coli extracts .

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 47 (1961) 1580-1588

- MESELSON, M., STAHL, F.W. et VINOGRAD, J. (1957)

Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients .

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 43 (1957) 581

- MESELSON, M. et NAZARIAN, G. M. (1963)

The transient state in density gradient centrifugation

Ultracentrifugation analysis in theory and
experiment . J. W. Williams . Academic Press
(1963)

- MIDGLEY, J. E. M. (1965)

The estimation of polynucleotide chain length by a chemical method

Biochem. biophys. Acta., 108 (1965) 340-347

- MONTAGNIER, L. et SANDERS, F. K. (1963)

Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid

Nature, 199 (1963) 664-667

- MOUCHES

Thèse de 3^o cycle . Université de Bordeaux II
(1975)

- NILSSON-TILLGREN, T. (1970)

Studies on biosynthesis on TMV . Isolation and characterization of the replicative form and the replicative intermediate RNA .

Molec. gen. Genetics., 109 (1970) 246-256

- NONOYAMA, M. et IKEDA, Y. (1964)

Ribonuclease resistant RNA found in cells of Escherichia Coli infected with RNA phage .

J. molec. Biol., 9 (1964) 763-771

- ORTEGA, J. P. et HILL, W. E. (1973)

A molecular weight determination of the 16S ribosomal ribonucleic acid from E. Coli.

Biochemistry, 12 (1973) 3241-3243

- PETER, R., STEHELIN, D., REINBOLT, J., PETER, C. et DURANTON, M. (1973)

Etude de la structure primaire de la protéine du VMJN . II . Sequence des peptides tryptiques de la protéine aminoéthylée .

III . Sequence des

peptides chymotryptiques de la protéine aminoéthylée et enchaînement des peptides tryptiques .

Biochem. biophys. Acta, 317 (1973) 240-265

- PITOUT, J. M. (1969)

The relation between the sedimentation coefficient and molecular weight of
DNA molecules

J. of the South African chem. Inst., 22 (1969)
132-137

- PINCK, L, et HIRTH, L. (1972)

The replicative RNA and the viral RNA synthesis rate in tobacco infected with
alfalfa mosaic virus .

Virology, 49 (1972) 413-425

- PLAGEMAN, P. G. W. et SWIM, H. E. (1966 a)

Effect of actinomycin D on the replication of mengo virus ribonucleic acid
in Novikoff heptoma cells .

Arch. Biochem. Biophys., 114 (1966) 360-363

- PLAGEMAN, P. G. W. et SWIM, H. E. (1966 b)

Symposium on replication of viral nucleic acid . III Replication of mengo
virus ribonucleic acid .

Bacteriol. Rev., 30 (1966) 288-308

- PONS, M. (1964)

Infectious double stranded poliovirus RNA .

Virology, 24 (1964) 467-473

- PLEIJ, C.W.A. (1973)

A study of TYMV-RNA.

Ed. Drukkerij. J.H. Pasmans, 's - Cravenhage

- PRING, D. R. (1972)

Barley stripe mosaic virus replicative form RNA : preparation and characterization .

Virology, 48 (1972) 22-29

- RALPH, R. K., MATTHEWS, R. E. F. et MATUS, A. I. (1965)

Isolation and properties of double-stranded viral RNA from virus infected plants .

J. molec. Biol. 11 (1965) 202-212

- REICH, E., FRANKLIN, R. M., SHATKIN, A. J. et TATUM, E. L. (1961)

Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production .

Science, 134 (1961) 556-557

- REICH, E., FRANKLIN, R. M., SHATKIN, A. J. et TATUM, E. L. (1962)

Action of actinomycin D on animal cells and viruses .

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. 48 (1962)

1238-1245

- REICH, E., et GOLDBERG, I. H. (1964)

Actinomycin and nucleic acid fonction

Progress in nucleic acid research and molecular
biology, vol3, Academic Press, New-York (1964)
183-234

- SÄNGER, H. L. et KNIGHT, C. A. (1963)

Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus infected tobacco
leaves .

Biochem. biophys. Res. Commun., 13(1963) 455

- SCHMID, C. W. et HEARST, J. E. (1971)

Density - gradient sedimentation equilibrium of DNA and the effective gradient of several salts .

Biopolymers, 10 (1971) 1901

- SCHMID, C. W. et HEARST, J. E. (1972)

The approach to equilibrium in a boyant-density gradient .

Biopolymers, 11 (1972) 1765-1769

- SHATKIN, A. J. (1962)

Actinomycin inhibition of ribonucleic acid synthesis and poliovirus infection of HeLa cells .

Biochem. biophys. Acta, 61 (1962) 310-313

- SHIPP, W. et HASELKORN, R. (1964)

Double stranded RNA from tobacco leaves infected with TMV

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. 52 (1964)

401-408

- SOBELL, M. H. (1973)

The stereochemistry of actinomycin binding to BNA and its implications in molecular biology .

Progress in nucleic acid research and molecular biology, vol. 13, Academic Press, New-York
(1973) 153-190

- STANLEY, W. M. et BOCK, R. M. (1965)

Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acids of Escherichia Coli .

Biochemistry 4 (1965) 1302-1311.

- STAYNOV, D. Z., PINDER, J. C. et GRATZER, W. B. (1972)

Molecular weight determination of nucleic acids by gel electrophoresis in non-aqueous solution .

Nature new biology, 235 (1972) 108-110

- STEERE, R. L. (1956)

Purification and properties of tobacco ringspot virus .

Phytopathology, 46 (1956) 60-69

- STRAUSS, J. H., KELLY, R. B. et SINSHEIMER, R. L. (1968)

Denaturation of RNA with dimethylsulfoxide .

Biopolymers, 6 (1968) 793-807

- STRAZIELLE, C., BENOIT, H. et HIRTH, L. (1965)

Particularités structurales de l'ARN extrait du VMJN.II

J. molec. Biol., 13 (1965) 735-748

- STUDIER, F. W. (1965)

Sedimentation studies of the size and shape of DNA .

J. molec. Biol., 11 (1965) 373-390

- SVEDBERG, T. et PEDERSEN, K. O. (1940)

The ultracentrifuge

Oxford University Press, Oxford (1940)

- THACH, S. S., DOBBERTIN, D., LAWRENCE, C., GOLINI, F., et THACH, R. E. (1974)

The mechanism of viral replication . Structure of replication complexes of encephalomyocarditis virus .

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 71 (1974)

2549-2553

- THACH, S. S. et THACH, R. E. (1973)

Mechanism of viral replication . I . Structure of replication complexes of R 17 bacteriophage .

J. molec. Biol., 81 (1973) 367-380

- TRAUB, P., MIZUSHIMA, S., LOWRY, C. V. et NOMURA, M. (1971)

Reconstitution of ribosomes from subribosomal components .

Methods in enzymology, vol. 20, part. C.,

(1971) 379

- VAN GRIENSVEN, L. J. L. D., VAN KAMMEN, A. et REZELMAN, G. (1973)

Characterization of the double-stranded RNA isolated from cow-pea mosaic virus infected vigna leaves .

J. gener. Virology, 18 (1973) 359-367

- VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. et VAN KAMMEN, A. (1969)

The isolation of a ribonuclease resistant RNA induced by cowpea mosaic virus :
evidence for two double-stranded RNA components .

J. gener. Virology, 4 (1969) 423-428

- VINOGRAD, J. et HEARST, J. E. (1962)

Equilibrium sedimentation of macromolecules and viruses in a density gradient .

Fortschr. chem. Org. Naturstoffe, 20 (1962)

372-422

- WAKE, R. G. et BALDWIN, R. L. (1962)

Physical studies on the replication of DNA in vitro .

J. molec. Biol., 5 (1962) 201-216

- WARING, M. (1970)

Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics
and drugs : evidence for molecular models involving intercalation .

J. molec. Biol. , 54 (1970) 247-279

- WEISSMANN, C., BORST, P., BURDON, R. H., BILLETER, N. A., et OCHOA, S. (1964)

Replication of viral RNA . III Double stranded replicative form of MS 2 phage .

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 51 (1964)

682-690

- WEISSMANN, C., FEIX, G., SLOR, H. et POLLET, G. (1967)

Replication of viral RNA, XIV single-stranded minus strands as template for the synthesis of viral plus strands in vitro .

Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 57 (1967)

1870-1877

- WOLSTENHOLME, D. R. et BOCKSTAHLER, L. E. (1967)

Electron microscopy of double-stranded RNA induced by turnip yellow mosaic virus and tobacco mosaic virus .

Molec. gen. Genetics, 100 (1967) 349-357

- ZIMMERMANN, E. F., HEETER, M. et DARNELL, J. E. (1963)

RNA synthesis in poliovirus infected cells .

Virology, 19 (1963) 400-408

- TABLE DES MATIERES -

Introduction	1
CHAP. I ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE	11
I - 1 Coefficient de sédimentation	11
I - 2 Equilibre de sédimentation en gradient de densité	16
I - 2 - 1 Equilibre de sédimentation	17
I - 2 - 2 Transition vers l'équilibre	20
I - 3 Dispositif expérimental	21
I - 3 - 1 Rotor	21
I - 3 - 2 Cellules de centrifugation	21
I - 3 - 3 Dispositifs d'observation	22
CHAP. II PREPARATION DE RNA MONOCATENAIRE	25
II - 1 Purification des virions	25
II - 2 Preparation du RNA du VMJN	27
II - 3 Préparation de RNA ribosomaux	29
II - 3 - 1 Culture des bactéries	29
II - 3 - 2 Préparation des ribosomes	29
II - 3 - 3 Extraction des RNA ribosomaux	30
CHAP. III PROPRIETES DU RNA DU VMJN	31
III - 1 Caractérisation du RNA viral	31
III - 1 - 1 Spectre d'absorption	31
III - 1 - 2 Ultracentrifugation analytique	33

III - 1 - 3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	35
- Mode opératoire	35
- Résultats	37
- Influence de la quantité de RNA déposée sur le gel	40
III - 2 Action de l'EDTA sur le RNA du VMJN	42
III - 2 - 1 Mode opératoire	42
III - 2 - 2 Résultats	42
- Ultracentrifugation analytique	43
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	44
- Sédimentation de bande en gradient de saccharose	46
III - 3 Action de la chaleur sur le RNA du VMJN	48
 CHAP. IV PREPARATION DU RNA BICATENAIRE	 51
IV - 1 Inoculation des plantes	51
IV - 2 Extraction des acides nucléiques	52
IV - 3 Elimination des DNA	53
IV - 4 Filtration sur sephadex	55
IV - 5 Chromatographie sur cellulose	56
IV - 6 Centrifugation en gradient de saccharose	58
IV - 7 Synthèse in vitro	60
 CHAP. V PROPRIETES PHYSIQUES DU RNA BICATENAIRE	 63
V - 1 Spectre d'absorption	63
V - 2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	65

V - 3 Coefficient de sédimentation	67
V - 3 - 1 Mode opératoire	67
V - 3 - 2 Résultats	67
V - 4 Répartition en poids des coefficients de sédimentation	70
V - 5 Répartition en poids des masses moléculaires	74
V - 6 Diffraction des rayons X	77
V - 7 Equilibre de sédimentation en gradient de densité	78
V - 7 - 1 Mode opératoire	78
V - 7 - 2 Densité de solutions de sulfate de césium en fonction de la température	79
V - 7 - 3 Détermination du gradient de densité	80
V - 7 - 4 Application au cas du RNA viral	85
V - 7 - 5 Application au cas du RNA bicaténaire	87
V - 7 - 6 Transition vers l'équilibre	91
V - 8 Propriétés du composant mineur B	93
 CHAP. VI DEGRADATION DU RNA BICATENAIRE	 95
VI - 1 Dégradation enzymatique	96
VI - 1 - 1 Mode opératoire	96
VI - 1 - 2 Résultats	97
- vitesse de sédimentation	97
- Equilibre de sédimentation en gradient de densité	99
VI - 2 Dénaturation thermique	104
VI - 2 - 1 Principe	104

VI - 2 - 2 Mode opératoire	105
VI - 2 - 3 Résultats	105
VI - 3 Action de la formaldéhyde	109
VI - 3 - 1 Mode opératoire	110
VI - 3 - 2 Résultats	111
,	
DISCUSSION	119
RESUME ET CONCLUSION	123
ABREVIATIONS	127
COMPOSITION DES SOLVANTS LES PLUS UTILISES	128
BIBLIOGRAPHIE	129

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 20 février 1975

Le Président du Conseil Scientifique

de l'Université de Nancy I

